



**Alexandra Sofia Vasques Gonçalves Serra**  
Mestre em Química Analítica Aplicada

## **Isolamento e Caracterização de Enzimas Multihémicas de Origem Microbiana e sua Aplicação no Desenvolvimento de Biossensores.**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Química Sustentável

Orientador: Doutora Maria Gabriela Machado de  
Almeida, Investigadora Auxiliar da Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor José João Galhardas de Moura,  
Professor Catedrático Aposentado da Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor António Manuel Dias de Sá Nunes dos Santos  
Arguentes: Doutora Margarida Maria Portela Correia dos Santos Romão  
Doutor Stéphane Pierre Besson  
Vogais: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo  
Doutora Ana Pimenta da Gama da Silveira Viana Semedo



Janeiro 2012



# **Isolamento e Caracterização de Enzimas Multihémicas de Origem Microbiana e sua Aplicação no Desenvolvimento de Biossensores.**

***Copyright* by Alexandra Sofia Vasques Gonçalves Serra; FCT/UNL – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; UNL – Universidade Nova de Lisboa**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



A  
Joaquim Luís Rodrigues da Silva Proença



## Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida e Professor Doutor José João Galhardas Moura, pela oportunidade de trabalhar sobre a sua competência, numa área de investigação que, até então, me era em grande parte desconhecida e que permitiu alargar os meus horizontes científicos, proporcionando-me a descoberta de todo um Universo de novas possibilidades.

À Professora Doutora Isabel Moura, pela cooperação científica e facilidades concedidas, nomeadamente a nível dos trabalhos desenvolvidos em biologia molecular e na purificação das proteínas.

À Doutora Susana Andrade, do Abteilung für Molekulare Strukturbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität em Göttingen, Alemanha, pela gentileza com que me acolheu no seu laboratório, e pelos conhecimentos transmitidos no domínio da cristalografia de proteínas.

À Doutora Ana Viana, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela preparação e aquisição das imagens de AFM e pelos ensinamentos ministrados no campo da SAMs.

À Doutora Elena Jubete, da CIDETEC, Espanha, pelo seu apoio técnico e envolvimento pessoal no desenvolvimento do biossensor electroquímico específico para nitritos baseado na co-imobilização da  $cd_1NiR$  e do cit- $c_{552}$ .

À Engenheira Sónia Jorge, pelo trabalho de optimização das condições de preparação dos eléctrodos, na qual se baseou o desenvolvimento do biossensor electroquímico específico para nitritos baseado na co-imobilização da  $cd_1NiR$  e do cit- $c_{552}$ . O seu apoio, entusiasmo e dedicação foram preponderantes para o sucesso deste projecto.

À Doutora Marta Carepo, pela preciosa ajuda e instrução que me forneceu no domínio da biologia molecular e que permitiu a sequenciação da desulfoviridina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

À Doutora Smilja Todorovic, do Laboratório de espectroscopia Raman do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade de Lisboa, pela preciosa colaboração da qual resultou o estudo da  $cd_1NiR$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* por espectroscopia de ressonância Raman e ressonância Raman amplificada por superfície.

À Professora Doutora Maria João Romão, por me facilitar o acesso ao seu laboratório e permitir a realização dos ensaios preliminares de cristalização da desulfoviridina.

À Doutora Teresa Sacadura Santos Silva, pela gentileza de construir os mapas de potencial electrostático da superfície da  $cd_1NiR$ .

À Doutora Patrícia Paes de Sousa, pelos valiosos conselhos transmitidos no campo da bioelectroquímica.

Ao Doutor Stéphane Besson, pelas explicações e conselhos relativos à  $cd_1NiR$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Ao Doutor Sergey Bursakov, os conselhos dados em matéria de purificação, e todos os outros, que não consegui interpretar em devido tempo.

Aos Doutores Américo Duarte e Simone Dell'Aqua, os preciosos conselhos e auxílio prestados em matéria de purificação de proteínas.

À Doutora Marta Santos, pela sequenciação do *n*-terminal da desulfovirdina e...por tudo o resto!

À Doutora Luísa Maia, pela forma como sempre procurou inculcar-me serenidade e bom senso quando estes me faltavam.

À Mestre Ana Teresa Lopes, pelo apoio (técnico e pessoal), paciência, empatia, gentileza, dedicação, profissionalismo...E todas as outras inúmeras qualidades que a caracterizam enquanto pessoa e, sobretudo, enquanto profissional de excepção!

À Doutora Célia Silveira, com quem partilhei grande parte do meu tempo (e espaço) ao longo destes anos. Não há no Universo palavras suficientes para transmitir o quanto lhe estou grata. Foi uma honra e um privilégio trabalhar ao seu lado. Não é, de todo comum, alguém com tão elevado grau de eficiência e profissionalismo ser, simultaneamente, um manancial de sapiência que generosamente distribui a quem procura o seu auxílio. Assumindo por diversas vezes, responsabilidades que não lhe são, de todo, imputáveis. Devo-lhe grande parte do que aprendi “na bancada” e muito, mas mesmo muito mais...

À minha família, pelo apoio incondicional que sempre me foi concedido, pelas minhas ausências (e presenças conturbadas), pelos sacrifícios impostos pelas minhas escolhas...Mãe, Ricardo, sem vocês não teria conseguido. Avó, Quim, que alegria seria partilhar este momento convosco! Ana Luísa, meu amor...tens mais horas de “trabalho de bancada” que muitos finalistas de Licenciatura...obrigada pela tua colaboração (mesmo que involuntária)!

Agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia a Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/22800/05, co-financiada pelo Programa Operacional da Ciência e Inovação (POCI) e pelo Fundo Social Europeu.



## Resumo

O trabalho apresentado na presente dissertação, tem por tema central, a construção de biossensores enzimáticos e electroquímicos específicos para nitrito e sulfito baseados, respectivamente, nas redutases do nitrito ( $cd_1NiR$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*), e do sulfito (desulfoviridina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774), como elementos de reconhecimento biológico.

Apesar da estrutura cristalográfica da  $cd_1NiR$  não ter sido conseguida, a análise da sequência de resíduos de aminoácidos e a simulação da respectiva estrutura tridimensional indicam uma elevada semelhança estrutural com a enzima de *Pseudomonas aeruginosa*. Por espectroscopia de ressonância Raman, comprovou-se o número de coordenação, o estado de spin e o potencial formal dos dois co-factores, com a identificação parcial dos modos vibracionais de hemo  $d_1$ .

Foi construído um biossensor amperométrico para nitritos através da co-imobilização da  $cd_1NiR$  e do seu parceiro fisiológico, o citocromo- $c_{552}$ , que funcionou como mediador electrónico. A utilização de eléctrodos *screen printed* como plataforma de transdução conferiu ao sistema simplicidade operacional e portabilidade.

A adsorção da  $cd_1NiR$  numa superfície de Au modificado com monocamadas automontadas permitiu alcançar pela primeira vez, usando a técnica de voltametria cíclica, uma resposta electroquímica directa da proteína. A reacção de redução envolve a transferência de um electrão e de um protão, e é seguida de uma alteração estrutural. O processo anódico, quando visualizado, não deverá representar a reacção inversa. Nas condições testadas, não foi detectada actividade catalítica na presença de nitrito.

A desulfoviridina apresenta-se na forma de um complexo heteromérico, numa configuração  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ . Com base na estrutura primária determinada, simulou-se a estrutura tridimensional da proteína. Foram quantificados 17 átomos de Fe por complexo proteico, dados que contrastam com os reportados para a proteína de *D. vulgaris*, e que podem estar na génese da ausência de actividade catalítica verificada no decurso dos ensaios electroquímicos, a qual impossibilitou o desenvolvimento de um biossensor com recurso a esta enzima.

**Termos chave:**  $cd_1NiR$ , desulfoviridina, caracterização, biossensores electroquímicos, nitrito, sulfito.



## ***Abstract***

The central theme of the work presented in this dissertation is the construction of electrochemical enzymatic biosensors specific for nitrite and sulfite based on, respectively, the nitrite reductase *cd<sub>1</sub>NiR* from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* and the sulfite reductase desulfoviridin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, as biological recognition elements.

Although the crystal structure from the *cd<sub>1</sub>NiR* was not obtained, the analysis of the amino acid residue sequence and simulation of the respective tridimensional structure indicates an high structural resemblance with the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. By Raman resonance spectroscopy, it was established the coordination numbers, spin states and formal potentials from both the co-factors, with a partial identification of the vibrational modes from the *d<sub>1</sub> heme*.

An amperometric nitrite biosensor was constructed through the co-immobilization of the *cd<sub>1</sub>NiR* with its physiological partner, cytochrome-*c<sub>552</sub>*, working as electronic mediator. The use of screen printed electrodes as transduction platform gave an high operational simplicity and portability to the system.

The adsorption of the *cd<sub>1</sub>NiR* onto a gold surface modified with self assembled monolayers, allowed to reach, for the first time, a direct electrochemical response from the protein by cyclic voltammetry. The reduction reaction involves the transfer of an electron and a proton, followed by a structural modification. The anodic process, when observed, does not seem to represent the inverse reaction. Under the conditions tested, catalytic activity in the presence of nitrite was not detected.

The desulfoviridin was purified as an heteromeric complex, in a  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  configuration. Based on the primary structure determined, the tridimensional structure of the enzyme was simulated. Seventeen iron atoms per protein complex were quantified, data contrasting the reported for the *D. vulgaris* protein, and that might be the cause of the lack of catalytic activity observed on the electrochemical experiments, and that prevented the development of a biosensor using this enzyme.

**Keywords:** *cd<sub>1</sub>NiR*, desulfoviridin, characterization, electrochemical biosensors, nitrite, sulfite.



# Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Índice Geral .....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xvii
Abreviaturas .....	xix
Organismos .....	xxiii

## PARTE I: Citocromo $cd_1$ ( $cd_1NiR$ ) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Isolamento, Caracterização e Desenvolvimento de um Biossensor Electroquímico para Determinação de Nitritos.

<b>I.1 Objectivos .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2.1 Nitritos.....</b>	<b>1</b>
I.2.1.1 Ocorrência.....	1
I.2.1.2 Riscos Ambientais.....	2
I.2.1.3 Efeitos na Saúde.....	2
I.2.1.4 Regulamentação.....	3
I.2.1.5 Fisiologia.....	4
<b>I.2.2 Biossensores Enzimáticos Para a Quantificação de Nitritos .....</b>	<b>5</b>
I.2.2.1 Biossensores Amperométricos e/ou Voltamétricos Baseados em Proteínas Inespecíficas para Determinação de Nitritos.....	6
I.2.2.2 Biossensores Amperométricos e/ou Voltamétricos Baseados em Redutases do Nitrito.....	8
I.2.2.2.1 Electroquímica Mediada.....	10
I.2.2.2.1.1 Mediadores Artificiais.....	11
I.2.2.2.1.2 Mediadores Fisiológicos.....	11
I.2.2.2.2 Electroquímica Directa.....	12
I.2.2.3 Biossensores Não - Amperométricos .....	13
I.2.2.3.1 Detecção Potenciométrica .....	13
I.2.2.3.2 Detecção Condutimétrica.....	13
I.2.2.3.3 Detecção Óptica.....	14
<b>I.2.3 Tecnologias Emergentes em Biossensores .....</b>	<b>17</b>
I.2.3.1 Monocamadas Automontadas.....	17
I.2.3.1.1 Aspectos Gerais .....	17
I.2.3.1.2 Aplicação em Biossensores .....	19
I.2.3.2 Eléctrodos <i>Screen-Printed</i> (SPEs – <i>Screen-Printed Electrodes</i> ).....	21
I.2.3.2.1 Importância Estratégica .....	21
I.2.3.2.2 Eléctrodos .....	22

<b>I.2.4 O citocromo-<math>cd_1</math> (<math>cd_1NiR</math>).....</b>	<b>24</b>
I.2.4.1 Ocorrência e Função Biológica.....	24
I.2.4.2 O <i>hemo d<sub>1</sub></i> .....	25
I.2.4.3 A $cd_1NiR$ de <i>Paracoccus pantotrophus</i> .....	26
I.2.4.4 A $cd_1NiR$ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
I.2.4.5 Processos de Transferência Electrónica .....	29
I.2.4.6 Parceiros Fisiológicos.....	30
<b>I.2.5 <i>Pseudomonas nautica</i>, <i>Marinobacter aquaeolei</i>, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>I.3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>33</b>
<b>I.3.1 Materiais e Reagentes .....</b>	<b>33</b>
I.3.1.1 Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$ .....	33
I.3.1.2 Electroquímica.....	33
<b>I.3.2 Equipamentos.....</b>	<b>34</b>
I.3.2.1 Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$ .....	34
I.3.2.2 Electroquímica.....	35
I.3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Raman .....	35
I.3.2.4 Microscopia de força Atómica .....	36
<b>I.3.3 Procedimentos Experimentais.....</b>	<b>36</b>
I.3.3.1 Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$ .....	36
I.3.3.2 Cristalização da $cd_1NiR$ .....	37
I.3.3.3 Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Actividade da $cd_1NiR$ , co-imobilizada com o seu Parceiro Fisiológico em CPSPEs.....	37
I.3.3.4 Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Resposta Directa da $cd_1NiR$ num Sistema Electroquímico.....	38
I.3.3.4.1 Limpeza do Eléctrodo de Trabalho.....	38
I.3.3.4.2 Selecção do Modificador de Superfície .....	38
I.3.3.4.3 Caracterização do Eléctrodo Modificado .....	39
I.3.3.4.4 Ensaio de Actividade para o Oxigénio Molecular .....	40
I.3.3.4.5 Ensaio com Eléctrodos Modificados com SAMs Mistas.....	40
I.3.3.5 Espectroscopia de Ressonância Ramman .....	41
I.3.3.6 Ressonância Ramman Amplificada por Superfície .....	41
I.3.3.7 Microscopia de força Atómica.....	42
<b>I.3.4 Aplicações Bioinformáticas.....</b>	<b>43</b>
<b>I.4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>44</b>
<b>I.4.1 Purificação dos citocromos <math>c_{552}</math> (cit-<math>c_{552}</math>) e <math>cd_1</math> (<math>cd_1NiR</math>) da bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> estirpe 617.....</b>	<b>44</b>
<b>I.4.2 Análise da Sequência de Resíduos de Aminoácidos .....</b>	<b>46</b>
<b>I.4.3 Previsão da Estrutura Tridimensional da <math>cd_1NiR</math> de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>I.4.4 Cristalografia de Raios – X .....</b>	<b>51</b>

<b>I.4.5 Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Co – Imobilização da <math>cd_1NiR</math> com o seu Parceiro Fisiológico (cit-<math>c_{552}</math>)....</b>	<b>52</b>
I.4.5.1 Caracterização Electroquímica do cit- $c_{552}$ Co – Imobilizado com a $cd_1NiR$ na Matriz Polimérica.....	53
I.4.5.2 Resposta a Nitrito.....	56
I.4.5.3 Influências da Temperatura e do pH.....	59
I.4.5.4 Análise de Interferentes.....	60
I.4.5.5 Reacção com $O_2$ .....	60
<b>I.4.6 Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Resposta Directa da <math>cd_1NiR</math> num Sistema Electroquímico.....</b>	<b>63</b>
I.4.6.1 Selecção do Modificador de Superfície.....	63
I.4.6.2 Estudo do Comportamento Electroquímico da $cd_1NiR$ Adsorvida num Eléctrodo modificado com uma SAM de MUA.....	65
I.4.6.2.1 Electrões Transferidos e Adsorção .....	69
I.4.6.2.2 Coeficiente de Transferência de Carga ( $\alpha$ ) e Constante de Transferência Electrónica Heterogénea ( $K_s$ ).....	71
I.4.6.2.3 Reacção Química Acoplada – Transferência de Protões .....	72
I.4.6.3 Microscopia de Força Atómica.....	73
I.4.6.4 Estudo do Comportamento Electroquímico da $cd_1NiR$ Adsorvida num Eléctrodo modificado com SAMs Mistas. ....	74
I.4.6.5 Ressonância Raman. ....	76
I.4.6.5.1 Espectroscopia de Ressonância Raman.....	76
I.4.6.5.2 Ressonância Raman Amplificada por Superfície .....	80
<b>I.5 Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>83</b>
<b>I.6 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>85</b>
<b>I.7 Bases de Dados e Programas Informáticos de Livre Utilização .....</b>	<b>92</b>

**PARTE II: Desulfoviridina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. Isolamento, Caracterização e Desenvolvimento de um Biossensor Electroquímico para Determinação de Sulfito.**

<b>II.1 Objectivos.....</b>	<b>93</b>
<b>II.2 Introdução Geral .....</b>	<b>93</b>
<b>II.2.1 Sulfitos.....</b>	<b>93</b>
II.2.1.1 Breve Caracterização Química das Espécies de Enxofre.....	93
II.2.1.2 Aplicações Industriais .....	95
II.2.1.3 Efeitos na Saúde.....	97
II.2.1.4 Normas de Aplicação .....	98
II.2.1.5 Métodos de Quantificação .....	99
<b>II.2.2 Redutases do Sulfito .....</b>	<b>104</b>
II.2.2.1 Redutases do Sulfito Assimilativas .....	106
II.2.2.2 Redutases do Sulfito Dissimilativas .....	108
II.2.2.3 A Desulfoviridina .....	109
II.2.2.3.1 Caracterização Estrutural .....	110
II.2.2.3.2 Mecanismos de Reacção.....	113

<b>II.3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>116</b>
<b>II.3.1 Materiais e Reagentes .....</b>	<b>116</b>
II.3.1.1 Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilativa Desulfoviridina .....	116
II.3.1.2 Determinação da Estrutura Primária.....	117
II.3.1.3 Electroquímica.....	117
<b>II.3.2 Equipamentos.....</b>	<b>119</b>
II.3.2.1 Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilativa Desulfoviridina .....	119
II.3.2.2 Determinação da Estrutura Primária.....	119
II.3.2.3 Electroquímica.....	120
<b>II.3.3 Procedimentos Experimentais.....</b>	<b>120</b>
II.3.3.1 Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilativa Desulfoviridina .....	120
II.3.3.2 Determinação da Estrutura Primária.....	122
II.3.3.3 Electroquímica.....	123
<b>II.3.4 Aplicações Bioinformáticas.....</b>	<b>125</b>
II.3.4.1 Caracterização Bioquímica.....	125
II.3.4.2 Estruturas.....	125
II.3.4.2.1 Determinação da Estrutura Primária .....	125
II.3.4.2.2 Determinação das Estruturas Terciária e Quaternária .....	126
<b>II.4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>127</b>
<b>II.4.1 Purificação da redutase do sulfito dissimilativa Desulfoviridina .....</b>	<b>127</b>
<b>II.4.2 Caracterização Bioquímica .....</b>	<b>129</b>
II.4.2.1 Massa Molecular .....	129
II.4.2.2 Determinação da Absortividade Molar .....	132
II.4.2.3 Co-Factores .....	133
<b>II.4.3 Sequência de Resíduos de Aminoácidos.....</b>	<b>133</b>
<b>II.4.4 Previsão das Estruturas Terciária e Quaternária.....</b>	<b>137</b>
<b>II.4.5 Electroquímica .....</b>	<b>140</b>
II.4.5.1 Azul de Bromofenol .....	141
II.4.5.2 Viologénio de Metilo .....	143
II.4.5.3 Vermelho Neutro .....	145
II.4.5.4 Azul de Meldola/NADH .....	147
II.4.5.5 Viologénio de Benzilo .....	148
II.4.5.6 Fenosafranina .....	150
<b>II.5 Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>152</b>
<b>II.6 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>154</b>
<b>II.7 Bases de Dados e Programas Informáticos de Livre Utilização .....</b>	<b>160</b>



# Índice de Figuras

## Parte I:

<b>Fig. I.1:</b> Estrutura tridimensional de algumas redutases do nitrito.....	8
<b>Fig. I.2:</b> Representação esquemática dos biossensores com sinal produzido via electroquímica mediada e transdução amperométrica e/ou voltamétrica. ....	11
<b>Fig. I.3:</b> Esquema reaccional para o biossensor de nitritos baseado na actividade da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , com recurso ao cit- <i>c<sub>522</sub></i> proveniente da mesma fonte bacteriana como mediador. ....	12
<b>Fig. I.4:</b> Representação esquemática dos biossensores com sinal produzido via electroquímica directa e transdução amperométrica e/ou voltamétrica. ....	12
<b>Fig. I.5:</b> Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução potenciométrica.....	13
<b>Fig. I.6:</b> Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução condutimétrica.....	14
<b>Fig. I.7:</b> Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução óptica.....	14
<b>Fig. I.8:</b> Diagrama esquemático de uma SAM ideal, formada por um alcanotiol numa superfície monocristalina de Au (111) (Love <i>et al.</i> , 2005).....	18
<b>Fig. I.9:</b> Diagrama representativo da adsorção de uma proteína a uma SAM, por via de interacção electrostática.....	19
<b>Fig. I.10:</b> Reacções de ligação de ERBs a SAMs (Arya <i>et al.</i> , 2009) .....	20
<b>Fig. I.11:</b> Configurações usuais de SPEs disponíveis comercialmente (Tudorache & Bala, 2007).....	23
<b>Fig. I.12:</b> Exemplo de um chip ( <i>micro-array</i> ) <i>screen-printed</i> com ouro (Metters <i>et al.</i> , 2011).....	24
<b>Fig. I.13:</b> Estrutura do <i>hemo d<sub>1</sub></i> . ....	25
<b>Fig. I.14:</b> Estrutura tridimensional da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>Paracoccus pantotrophus pantotrophus</i> (Williams <i>et al.</i> , 1997).....	26
<b>Fig. I.15:</b> Representação esquemática das alterações sofridas a nível dos <i>hemos</i> na redução da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>Paracoccus pantotrophus</i> .....	27
<b>Fig. I.16:</b> Representação esquemática da redução da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
<b>Fig. I.17:</b> Representação esquemática do centro activo da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , com NO ligado (Radoul <i>et al.</i> , 2011). ....	29

<b>Fig. I.18:</b> Mecanismo proposto para a redução sequencial da $cd_1NiR$ de Pa (Farver <i>et al.</i> , 2009).....	<b>30</b>
<b>Fig. I.19:</b> Estruturas tridimensionais dos parceiros fisiológicos de $cd_1NiRs$ provenientes de três organismos distintos. ....	<b>31</b>
<b>Fig. I.20:</b> Espectros de absorção UV/Vis dos citocromos purificados de <i>M. hydrocarb.</i> antes (linha contínua) e após redução com ditionito (linha tracejada). ....	<b>44</b>
<b>Fig. I.21:</b> Fotografias de géis de poliacrilamida a 12,5% após electroforeses desnaturantes dos extractos proteicos.....	<b>45</b>
<b>Fig. I.22:</b> Recta de calibração para a determinação da MM da $cd_1NiR$ . ....	<b>46</b>
<b>Fig. I.23:</b> Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos para a $cd_1NiR$ de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Paracoccus pantotrophus</i> e <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	<b>47</b>
<b>Fig. I.24:</b> Construção do modelo para a estrutura monomérica da $cd_1NiR$ de <i>M. hydrocarb.</i> .....	<b>49</b>
<b>Fig. I.25:</b> Estruturas tridimensionais da $cd_1NiR$ .....	<b>50</b>
<b>Fig. I.26:</b> Distribuição do potencial coulombiano na superfície da $cd_1NiR$ de <i>M. hydrocarb.</i> .....	<b>51</b>
<b>Fig. I.27:</b> Fotografia de cristais de $cd_1NiR$ de <i>M. hydrocarb.</i> na forma nativa. ....	<b>52</b>
<b>Fig. I.28:</b> Esquema reaccional do bioelectrodo para a redução de nitrito a óxido e de oxigénio molecular a água, de acordo com um mecanismo EC. ....	<b>53</b>
<b>Fig. I.29:</b> Efeitos do Encapsulamento. ....	<b>54</b>
<b>Fig. I.30:</b> Dependência relativamente à velocidade de varrimento da resposta electroquímica do cit- $c_{552}$ , quando co-imobilizado com a $cd_1NiR$ numa matriz de PVA num CPSPE. ....	<b>55</b>
<b>Fig. I.31:</b> Resposta do biossensor a nitrito. ....	<b>57</b>
<b>Fig. I.32:</b> Resposta do biossensor a nitrito em diferentes condições de temperatura e pH. ..	<b>59</b>
<b>Fig. I.33:</b> Voltamogramas cíclicos traçados com o biossensor na presença de oxigénio dissolvido ou nitrito.....	<b>61</b>
<b>Fig. I.34:</b> Voltamogramas cíclicos traçados com o biossensor na presença de concentrações crescentes de nitrito (1 $\mu M$ a 1 mM). ....	<b>62</b>
<b>Fig. I.35:</b> Selecção do modificador de superfície. ....	<b>64</b>
<b>Fig. I.36:</b> Voltamogramas cíclicos traçados com o eléctrodo de Au modificado com a SAM de MUA e $cd_1NiR$ adsorvida.....	<b>66</b>
<b>Fig. I.37:</b> Voltamogramas cíclicos, traçados ao longo do tempo, a 20 mVs-1 em 50 mM tampão MES pH 6,3 com 150 mM KCl, na presença de $O_2$ . ....	<b>67</b>

<b>Fig. I.38:</b> Variação da intensidade de corrente, medida no ponto de inversão, em função do tempo. ....	<b>68</b>
<b>Fig. I.39:</b> Relação entre as intensidades de corrente e as velocidades de varrimento dos picos catódicos.....	<b>70</b>
<b>Fig. I.40:</b> Relação entre os potenciais dos picos catódicos e o logaritmo da velocidade de varrimento.....	<b>71</b>
<b>Fig. I.41:</b> Relação entre log(Ks) e pH para os potenciais dos picos catódicos.....	<b>72</b>
<b>Fig. I.42:</b> Relação entre E <sub>Pc</sub> e pH para algumas das v estudadas.....	<b>72</b>
<b>Fig. I.43:</b> Imagens de AFM de A) Au modificado com MUA e cd1NiR adsorvido; B) Au modificado com MUA; C) cd1NiR adsorvida em mica.....	<b>73</b>
<b>Fig. I.44:</b> Eléctrodos modificados com SAMs mistas.....	<b>75</b>
<b>Fig. I.45:</b> Região de altas frequências dos espectros de Ressonância Raman da <i>cd</i> <sub>1</sub> NiR no estado oxidado.....	<b>77</b>
<b>Fig. I.46:</b> Região de altas frequências dos espectros de Ressonância Raman da <i>cd</i> <sub>1</sub> NiR após redução com ascorbato.....	<b>78</b>
<b>Fig. 1.47:</b> Espectros RR da <i>cd</i> <sub>1</sub> NiR adquiridos com excitação a 647nm. ....	<b>79</b>
<b>Fig. 1.48:</b> Titulação preliminar da <i>cd</i> <sub>1</sub> NiR imobilizada em eléctrodos de Ag revestidos com uma SAM de cisteamina.....	<b>82</b>

## Parte II:

<b>Fig. II.1:</b> Diagrama de Pourbaix (simplificado) para os equilíbrios estáveis do sistema enxofre - água a 25°C (Pourbaix, 1974). ....	<b>94</b>
<b>Fig. II.2:</b> Química dos sulfitos. A conversão dos sais de enxofre em meio aquoso origina a produção <i>in situ</i> de dióxido de enxofre (Vally <i>et al</i> , 2009). ....	<b>95</b>
<b>Fig. II.3:</b> Esquema reaccional dos biossensores de sulfitos baseados no aumento de corrente provocado por acção do mediador na regeneração da SO. ....	<b>103</b>
<b>Fig. II.4:</b> Representação esquemática de biossensores de sulfitos baseados na actividade da SO. ....	<b>104</b>
<b>Fig. II.5:</b> Centro activo das SiRs. ....	<b>105</b>
<b>Fig. II.6:</b> Estrutura tridimensional da SiRHP nativa, na forma monomérica (Crane <i>et al</i> , 1995 – PDB-1AOP). ....	<b>107</b>
<b>Fig. II.7:</b> Mecanismo de redução do SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> catalisada pela SiRHP (Strupe & Getzoff, 2001).....	<b>107</b>

<b>Fig. II.8:</b> Estrutura tridimensional da Desulfoviridina de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough, na forma de complexo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ , no estado nativo (Oliveira <i>et al.</i> , 2008 – PDB-2V4J).....	<b>109</b>
<b>Fig. II.9:</b> Estrutura tridimensional da Desulfoviridina de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> , na forma de complexo $\alpha_2\beta_2$ , no estado nativo (Schiffer <i>et al.</i> , 2008 – PDB-3MMC). ....	<b>110</b>
<b>Fig. II.10:</b> Estrutura dos operões dos genes <i>dsrAB</i> e <i>dsrC</i> . ....	<b>111</b>
<b>Fig. II.11:</b> Mecanismo de redução do $\text{SO}_3^{2-}$ catalisada pela Dsv de <i>A. fulgidus</i> (Parey <i>et al.</i> , 2010). ....	<b>113</b>
<b>Fig. II.12:</b> Representação esquemática do mecanismo proposto para a redução do $\text{SO}_3^{2-}$ catalisada pela Dsv de <i>D. vulgaris</i> (Oliveira <i>et al.</i> , 2008). ....	<b>114</b>
<b>Fig. II.13:</b> Esquema de purificação para a Desulfoviridina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774. ....	<b>121</b>
<b>Fig. II.14:</b> Esquema de montagem do eléctrodo de trabalho para os ensaios com Desulfoviridina. ....	<b>122</b>
<b>Fig. II.15:</b> Espectro de absorção UV/Vis obtido com 1,5 $\mu\text{M}$ de Dsv de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774. ....	<b>127</b>
<b>Fig. II.16:</b> Linhas de géis, corados com Azul de Coomassie, resultantes da aplicação de PAGE às fracções de desulfoviridina. ....	<b>128</b>
<b>Fig. II.17:</b> Recta de calibração para a determinação da massa molecular da Dsv nativa. ...	<b>129</b>
<b>Fig. II.18:</b> Determinação da massa molecular das subunidades da Dsv. ....	<b>130</b>
<b>Fig. II.19:</b> Determinação da proporção relativa entre as subunidades da desulfoviridina....	<b>131</b>
<b>Fig. II.20:</b> Fragmentos de ADN resultantes das reacções de PCR. ....	<b>134</b>
<b>Fig. II.21:</b> Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das três subunidades da Dsv de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 ((a) - obtidas neste trabalho; (b) - depositadas por Lucas <i>et al.</i> (2009)), <i>D. desulfuricans</i> G20, <i>D. vulgaris</i> Hildenborough e <i>A. fulgidus</i> . ....	<b>134</b>
<b>Fig. II.22:</b> Construção do modelo para a estrutura tridimensional da Dsv de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774. ....	<b>138</b>
<b>Fig. II.23:</b> Sobreposição da estrutura conseguida por modelação (azul) com a estrutura que lhe serviu de modelo (rosa), a desulfoviridina de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough. ....	<b>139</b>
<b>Fig. II.24:</b> Estrutura da forma aniónica ( $\text{AB}^{2-}$ ) do azul de bromofenol, no estado oxidado, presente em solução para pH 7,6 e pH 5,5 (Saikia <i>et al.</i> , 2003; Shapovalov <i>et al.</i> , 2005)....	<b>141</b>
<b>Fig. II.25:</b> Ensaios realizados com azul de bromofenol e concentrações crescentes de sulfito.....	<b>142</b>
<b>Fig. II.26:</b> Semi-equação para a primeira redução do $\text{MV}^{2+}$ (Makarov <i>et al.</i> , 2002).....	<b>143</b>

<b>Fig. II.27:</b> Ensaios realizados com viologénio de metilo e concentrações crescentes de sulfito.....	<b>144</b>
<b>Fig. II.28:</b> Ensaios realizados com vermelho neutro e concentrações crescentes de sulfito.	<b>145</b>
<b>Fig. II.29:</b> Possível mecanismo da polimerização de azinas (Paulinkaite et al., 2010).....	<b>146</b>
<b>Fig. II.30:</b> Electropolimerização do VN a partir de uma solução contendo 1mM de VN num electrólito de suporte a pH 5,5 (Paulinkaite et al., 2010). ....	<b>146</b>
<b>Fig. II.31:</b> Ensaios como sistema mediador azul de Meldola/NADH a pH 7,6.....	<b>148</b>
<b>Fig. II.32:</b> Ensaios realizados com viologénio de benzilo e concentrações crescentes de sulfito.....	<b>149</b>
<b>Fig. II.33:</b> Ensaios com enzima na presença do mediador viologénio de benzilo. ....	<b>150</b>
<b>Fig. II.34:</b> Ensaios realizados com fenosafranina e concentrações crescentes de sulfito.....	<b>151</b>
<b>Fig. II.35:</b> Ensaios com enzima na presença do mediador fenosafranina.....	<b>152</b>



## Índice de Tabelas

### Parte I:

<b>Tabela I.1:</b> Descrição e parâmetros analíticos de biossensores para a determinação de nitrito baseados em NiRs como elementos de reconhecimento biológico.....	<b>15</b>
<b>Tabela I.2:</b> Modificadores de superfície utilizados na preparação dos eléctrodos de ouro com monocamadas automontadas.....	<b>34</b>
<b>Tabela I.3:</b> Composição das soluções de tióis mistas utilizadas na modificação da superfície dos eléctrodos de ouro com monocamadas automontadas.....	<b>41</b>
<b>Tabela I.4:</b> Máximos de absorvância dos espectros UV/Vis dos citocromos <i>c<sub>552</sub></i> e <i>cd<sub>1</sub></i> , purificados de <i>M. hydrocarb.</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabela I.5:</b> Graus de identidade e homologia encontrados entre a sequência de resíduos de aminoácidos da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> de <i>M. hydrocarb.</i> e as sequências da mesma proteína de outras bactérias.....	<b>48</b>
<b>Tabela I.6:</b> Parâmetros analíticos dos sensores amperométrico e voltamétrico na ausência e na presença de O <sub>2</sub> dissolvido no electrólito de suporte. ....	<b>62</b>
<b>Tabela I.7:</b> Constantes de transferência electrónica heterogénia ( <i>k<sub>s</sub></i> ) da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> a diferentes valores de pH. ....	<b>71</b>
<b>Tabela I.8:</b> Modos vibracionais de Ressonância Raman da <i>cd<sub>1</sub>NiR</i> nos estados oxidado e reduzido. ....	<b>79</b>

### Parte II:

<b>Tabela II.1:</b> Alguns exemplos de aplicações industriais de agentes sulfitantes e produtos alimentares, medicamentos e cosméticos que contêm sulfitos (Vally <i>et al</i> , 2009).....	<b>96</b>
<b>Tabela II.2:</b> Métodos para determinação de sulfitos.....	<b>100</b>
<b>Tabela II.3:</b> Principais características dos biossensores propostos para determinação de sulfitos.....	<b>102</b>
<b>Tabela II.4:</b> Mediadores electroquímicos utilizados neste trabalho.....	<b>118</b>
<b>Tabela II.5:</b> Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos correspondentes ao N-terminal de cada subunidade da Dsv de diferentes espécies pertencentes ao género <i>Desulfovibrio</i> . ....	<b>128</b>
<b>Tabela II.6:</b> Massa molecular da desulfoviridina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.....	<b>130</b>
<b>Tabela II.7:</b> Proporção relativa entre as subunidades da desulfoviridina. ....	<b>131</b>
<b>Tabela II.8:</b> Picos de absorção do espectro UV/Vis e absortividade molar da desulfoviridina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.....	<b>132</b>

<b>Tabela II.9:</b> Graus de identidade (Ident.) e similaridade (Simil.), calculados em termos de percentagem, encontrados entre a sequência de resíduos de aa da Dsv de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 e as sequências das restantes proteínas. ....	<b>136</b>
---	------------



## Abreviaturas

$\alpha$	coeficiente de transferência de carga
$\Delta E_p$	variação do potencial de pico
$\Delta I$	variação da intensidade de corrente
$\varepsilon$	absortividade molar
$\lambda$	comprimento de onda
$\varnothing$	diâmetro
$\Gamma$	índice de cobertura
$v$	velocidades de varrimento
<b>A</b>	área do eléctrodo
$A_{280\text{nm}}$	absorvância a 280 nm
aa	aminoácidos
$AB^{2-}$	forma aniónica do azul de bromofenol
$ABH_2$	forma neutra do azul de bromofenol
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	microscopia de força atómica, do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>
AM	azul de Meldola
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AQS	<i>Anthraquinone-2-sulfonic Acid</i>
aSiR	redutase do sulfito assimilativa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BATF	<i>Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms</i>
BCA	ácido biciconínico
BSA	albumina do soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CAPS	ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
CAPSO	ácido 3-(ciclo-hexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico
Cat	catalase
CCD	detector tipo <i>charge-coupled device</i>
ccNiR	citocromo- <i>c</i> redutase do nitrito dissimilativa
$cd_1\text{NiR(s)}$	redutase(s) do nitrito citocromo- $cd_1$
CIDETEC	Centro de Tecnologías Electroquímicas (San Sebastian, España)
cit- <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
cit- $c_{522}$	citocromo $c_{522}$
CPSPEs	eléctrodos de pasta de carbono <i>screen-printed</i> , do inglês <i>Carbon Paste Screen-Printed Electrodes</i>
Cs	modificador tiólico cisteamina
CuNiR	redutase do nitrito de cobre
<i>D.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
DDAB	aditivo, do inglês <i>didodecyl dimethyl ammonium bromide</i>
DET	transferência electrónica directa, do inglês <i>direct electron transfer</i>
$dH_2O$	água desionizada
DPP	polarografia diferencial pulsada, do inglês <i>differential pulse polarography</i>
DPV	voltametria diferencial pulsada, do inglês <i>differential pulse voltametry</i>
dSiR	redutase do sulfito dissimilativa
<i>dsrAB</i>	gene codificante das subunidades $\alpha$ e $\beta$ das dSiRs
<i>dsrC</i>	gene codificante da subunidade $\gamma$ das dSiRs
DsrC	subunidade $\gamma$ da Dsv
<i>dsrD</i>	gene codificante da hipotética subunidade $\delta$ das dSiRs
DsrK	subunidade catalítica do complexo DsrMKJOP
DsrMKJOP	complexo proteico membranar existente nas bactérias <i>Desulfovibrio</i>
Dsv	<i>desulfoviridina</i>

DTNB	5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)(reagente de Ellman)
$E_0$	potencial normal de redução
$E^0$	potencial formal de redução
EC	mecanismo electroquímico-químico, do inglês <i>electrochemical-chemical</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC/NHS	<i>N</i> -etil- <i>N</i> -(3-(dimetilamino)propil)carboimida acoplada a <i>N</i> -hidroxisuccinimida
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódio
EETMS	2-(3,4 epoxíciclohexil) etiltrimetoxissilano
EPR	espectroscopia de de ressonância paramagnética e electrónica
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
$E_{pa}$	potencial de pico catódico
$E_{pc}$	potencial de pico catódico
ERB	elementos de reconhecimento biológico
TE	transferência electrónica
EtOH	etanol
F	constante de Faraday
FAD	flavina adenina dinucleótido
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	flow injection analysis
FMN	flavina mononucleótido
Fs	fenosafranina
GaAs	superfícies metálicas semicondutoras de gálio e arsénio
GC	carbono vítreo, do inglês <i>glassy carbon</i>
GCE	eléctrodo de GC
GC/Pt	eléctrodo GC revestido com platina
GL	gama de linearidade
Hb	hemoglobina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	peroxidase do rábano, do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
HT	modificador tiólico 1-hexanotiol
I	Intensidade de corrente
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-AES	<i>inductively coupled plasma atomic emission spectrometer</i>
$I_p$	corrente de pico
$I_{pa}$	corrente de pico anódico
$I_{pc}$	corrente de pico catódico
IR	intensidade relativa
Iden.	grau de Identidade
Kav	coeficiente de partição
$K_{cat}$	constante catalítica
KEEG	base de dados, do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
$K_M$	constante de Michaelis
$K_M^{app}$	constante de Michaelis aparente
$k_s$	constante de transferência electrónica heterogénea
LD	limite de detecção
LMW	marcadores de baixa massa molecular, do inglês <i>low molecular weight</i>
Mb	mioglobina
MCD	<i>magnetic circular dichroism</i>
MET	transferência electrónica mediada, do inglês <i>mediated electronic</i>

1-metoxiPMS	<i>transfer</i>
MES	<i>1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate</i>
Mh	4-morfolineetanossulfonato de sódio
MM	<i>Marinobacter hidrocarbonoclasticus</i>
MPA	massa molecular
MUA	modificador tiólico ácido 3-mercaptopropiônico
MUNE	modificador tiólico ácido 11-mercaptoundecanóico
MUOH	modificador tiólico 1-undecanotiol
MV	modificador tiólico 11-mercpto-1-undecanol
n	viologénio de metilo
n.a.	n.º de electrões transferidos
NADPH	não aplicável
NADH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI	nicotinamida adenina dinucleótido
n.d.	base de dados, do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHE	não determinado
<i>Electrode</i>	eléctrodo de referência de hidrogénio, do inglês <i>Normal Hydrogen</i>
n.i.	não identificado
NiR(s)	redutase(s) do nitrito
NOCs	compostos carcinogénicos <i>N</i> -nitroso
N <sub>2</sub> OR	redutase do óxido nitroso
NO <sub>x</sub>	óxidos de azoto
NrfA	sub-unidade A da citocromo c redutase do nitrito
NrfH	sub-unidade H da citocromo c redutase do nitrito
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDB	do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilenoglicol
PG	grafite pirolítica, do inglês <i>pyrolytic graphite</i>
PGE	eléctrodo de trabalho de grafite pirolítica, do inglês <i>pyrolytic graphite electrode</i>
PHYRE	<i>Protein homology/analogy recognition engine</i>
Pp	<i>Paracoccus pantotrophus</i>
PRA-formaldeído	método para-rosanilina – formaldeído
prec.	precedente de...
Ps	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Pt	contra-eléctrodo de platina
PVA	<i>poly(vinyl alcohol)</i>
PVA-AWP	álcool polivinílico modificado com grupos azida pendentos, do inglês <i>poly(vinyl alcohol) azide-unit pendant water-soluble photopolymer</i>
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
Q	carga
R <sup>2</sup>	coeficiente de correlação
RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
Ref.	Referência bibliográfica
Rf	migração relativa
RP	razão de pureza
RR	espectroscopia de Ressonância Raman
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
rSiR	SiR reversa
SAMs	camadas automontadas, do inglês <i>Self Assembled Monolayers</i>
SCE	eléctrodo saturado de calomelanos, do inglês <i>Saturated Calomel</i>

SDS	<i>Electrode</i> dodecil-sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERR	espectroscopia de ressonância Raman amplificada por superfície, do inglês <i>Surface-Enhanced Resonance Raman sequential injection analysis</i>
SIA	
Simil.	Grau de <u>Similaridade</u>
SiRs	redutases do sulfito, do inglês <i>sulfite reductases</i>
SiRFP	sub-unidade $\alpha$ da aSiR de <i>E. coli</i> , do inglês <i>SiR flavoprotein</i>
SiRHP	sub-unidade $\beta$ da aSiR de <i>E. coli</i> , do inglês <i>SiR hemoprotein</i>
SNiRR	<i>sulfite and nitrite reductase repeat</i>
SO	oxidase do sulfito, do inglês <i>sulfite oxidase</i>
SPEs	do inglês <i>Screen-Printed Electrodes</i>
T	temperatura (em Kelvin)
TAPS	ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico
TEOS	<i>tetraethyl orthosilicate</i>
TFA	ácido trifluoracético, do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UHV	<i>Ultrahigh Vacuum</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV/Vis	Ultra-Violeta/Visível
VB	viologénio de benzilo
VN	vermelho neutro
$W_{1/2}$	largura a meia altura dos picos
$X_{ox}$	forma oxidada de X (sendo X uma espécie electroactiva já definida)
$X_{red}$	forma reduzida de X (sendo X uma espécie electroactiva já definida )

## Organismos

*Achromobacter cycloclastes*  
*Alcaligenes faecalis*  
*Archaeoglobus fulgidus* (A. *fulgidus*)  
*Archaeoglobus profundus*  
*Bilophila wadsworthia*  
*Chromatium vinosum*  
*Desulfovibrio desulfuricans* (D. *desulfuricans*)  
*Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27 774  
*Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6  
*Desulfovibrio desulfuricans* G20  
*Desulfovibrio gigas*  
*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (D. *vulgaris*)  
*Desulfovibrio vulgaris oxamicus*  
*Escherichia coli* (E. *coli*)  
*Marinobacter aquaeolei* (prec. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*)  
*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (M. *hydrocarb./ Mh*)  
*Paracoccus denitrificans*  
*Paracoccus pantotrophus* (P. *pantotrophus* / Pp)  
*Pseudomonas aeruginosa* (Ps. *aeruginosa* / Pa)  
*Pseudomonas denitrificans*  
*Pseudomonas nautica* (prec. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*)  
*Pseudomonas pantotrophus*  
*Pseudomonas stutzeri* (Ps. *stutzeri* / Ps)  
*Ralstonia eutropha*  
*Rhodobacter sphaeroides* (R. *sphaeroides*)  
*Sulfurospirillum deleyianum* (S. *deleyianum*)  
*Thiobacillus denitrificans*  
*Thiosphaera pantotropha* (prec. *Paracoccus pantotrophus*)



# **PARTE I:**

**Citocromo  $cd_1$  ( $cd_1NiR$ ) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Isolamento,  
Caracterização e Desenvolvimento de um  
Biossensor Electroquímico para  
Determinação de Nitritos.**





## **I.1 – Objectivos**

O principal objectivo deste trabalho foi a construção de um biossensor electroquímico específico para a determinação de nitritos, baseados na redutase do nitrito citocromo- $cd_1$  ( $cd_1NiR$ ), proveniente da bactéria marinha desnitrificante *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, utilizada como elemento de reconhecimento biológico.

Numa primeira etapa, procedeu-se à caracterização bioquímica e estrutural da enzima através de métodos bioquímicos, espectroscópicos, bioinformáticos e cristalográficos. Seguidamente, propôs-se o desenvolvimento de um biossensor amperométrico baseado numa resposta electroquímica mediada. Finalmente procurou-se criar um biossensor baseado na resposta electroquímica directa da  $cd_1NiR$ .

## **I.2 – Introdução Geral**

### **I.2.1 – Nitritos**

#### **I.2.1.1 – Ocorrência**

Os nitratos ( $NO_3^-$ ) e nitritos ( $NO_2^-$ ) encontram-se frequentemente em plantas, solos e águas. Uma vez que a sua química é praticamente indissociável, raramente são encontrados individualmente. Quando presentes em quantidades excessivas, estes iões podem exercer um impacto adverso tanto a nível da saúde pública quanto a nível ambiental. O nitrito é, de longe, o agente com maior grau de toxicidade porém, o nitrato, considerado tendencialmente inerte, pode facilmente ser reduzido a nitrito por via da acção bacteriana, quer no solo quer no trato digestivo dos animais (Moorcroft *et al.*, 2001; Dutt & Davis, 2002). Com o objectivo de controlar os riscos ambientais e de saúde pública causados pela exposição excessiva a nitratos e nitritos assistiu-se, nos últimos anos, à criação de regulamentação específica por parte da maioria das agências internacionais que visa a redução dos níveis permitidos destes iões em água potável e produtos alimentares. Mais, é comum o recurso à determinação de nitritos nos fluidos fisiológicos como meio de diagnóstico clínico (Ellis *et al.*, 1998).

### **I.2.1.2 – Riscos Ambientais**

A entrada antropogénica de nitritos e nitratos no meio ambiente pode ocorrer através de duas vias fundamentais: a conversão fotoquímica de óxidos de azoto (NOx) gerados por todo o tipo de processos de combustão (industrial, doméstico e automóvel) (Victorin, 1994; Moorcroft *et al.*, 2001; Galloway, 2003) e como consequência das suas aplicações (Dutton, 2004).

No que respeita aos nitratos, a fonte de poluição mais importante deriva do uso intensivo de fertilizantes azotados em actividades agrícolas, onde as condições anaeróbia dos solos poderão favorecer a sua conversão em nitritos (Dutt & Davis, 2002).

Para além de afectar o ciclo biogeoquímico do azoto pela interferência nos processos de nitrificação/desnitrificação (Galloway, 2003; Smolders *et al.*, 2010) a repercussão ecológica mais gravosa decorrente do excesso de nitratos/nitritos advém da contaminação dos lençóis freáticos, por percolação destes iões, altamente solúveis, através dos aquíferos naturais. Conjuntamente com os fertilizantes fosforados, o enriquecimento em nitrato das águas superficiais é também responsável pela eutroficação dos ecossistemas aquáticos e contaminação de peixes e moluscos (Dutt & Davis, 2002; Camargo & Alonso, 2006; Smolders *et al.*, 2010).

De acordo com o último relatório da Comissão Europeia [COM(2010)47] acerca da implementação da directiva comunitária 91/676/EEC sobre a protecção de águas subterrâneas e superficiais contra nitrato oriundo de fertilizantes agrícolas, a poluição por nitrato tem vindo a decrescer. Mesmo assim existem situações pontuais, em áreas geográficas específicas, onde são ainda necessários mais esforços no sentido de atingir, para a água, os padrões de qualidade exigidos na União Europeia.

### **I.2.1.3 – Efeitos na Saúde**

Ao contrário dos nitritos, cujas concentrações em matrizes vegetais são geralmente muito reduzidas; os nitratos ocorrem naturalmente na maioria dos vegetais comestíveis e em quantidades altamente variáveis. Para além dos alimentos naturalmente ricos em nitratos (alface, espinafres, agrião, beterraba, cerefólio e aipo) observa-se também uma elevada concentração destes iões em vegetais cultivados em solos sobrecarregados com fertilizantes azotados (Onyesom & Okoh, 2006; Ayaz *et al.*, 2007; Hord *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2010).

Conjuntamente com os sais de nitrato (E251, E252), os sais de nitrito (E249 e E250) têm sido amplamente utilizados no processamento de carnes curadas, peixes e alguns queijos, com a dupla finalidade de funcionarem como bactericidas e agentes realçantes das propriedades organolépticas tais como a cor, o odor e o sabor (Skovgaard, 1992; Siu & Henshall, 1998).

A exposição humana a este tipo de iões provém assim, largamente da ingestão deste tipo de produtos, nitratos provenientes de vegetais e nitritos provenientes de carnes processadas. Apenas uma pequena percentagem provém da água potável, dado que os níveis deste tipo de compostos encontram-se normalmente dentro dos níveis permitidos (Dutt & Davis, 2002; Hord *et al.*, 2009).

A principal patologia decorrente da ingestão excessiva de nitratos/nitritos é a metahemoglobinemia. O nitrito possui a capacidade de oxidar de forma irreversível a hemoglobina a metahemoglobina, uma conformação que é incapaz de ligar O<sub>2</sub> causando, entre outros sintomas, cianose. O grupo mais susceptível à metahemoglobinemia encontra-se na faixa etária dos lactentes, sendo esta doença vulgarmente conhecida por síndrome do bebé-azul, encontrando-se reportados alguns casos fatais, geralmente associados ao consumo de águas provenientes de fontes contaminadas (Dutt & Davis, 2002; Hord *et al.*, 2009).

Algumas preocupações têm vindo a ser colocadas relativamente à capacidade do nitrito para formar compostos carcinogénicos *N*-nitroso (NOCs) através de reacções com aminas secundárias (Lijinsky, 1999; Larsson *et al.*, 2006). Embora esteja comprovado que muitos NOCs são genotóxicos em modelos animais, ainda não se encontra provada de forma inequívoca a existência de uma relação directa entre o consumo de nitratos/nitritos e o risco de cancro (Hord *et al.*, 2009). Independentemente da controvérsia que envolve este tema, a informação produzida pela vigilância analítica do teor de nitritos em matrizes alimentares é fundamental para a gestão dos riscos para a saúde.

#### **I.2.1.4 – Regulamentação**

A questão da toxicidade dos nitratos/nitritos conduziu à implementação de regras que visam restringir os teores destes iões em águas potáveis e produtos alimentares. A Directiva Europeia 98/83/EC estabelece que os níveis máximos admitidos em água potável de nitrato e nitrito são respectivamente, 50 e 0,1 ppm. A Organização Mundial de Saúde (WHO/SDE/WSH/07.01/16) estabeleceu para o nitrato um limite semelhante, permitindo contudo um limite de 3 ppm para o teor em nitrito.

A recente directiva comunitária 2006/52/ EC veio implementar uma redução nos níveis de nitrato e nitrito autorizados em certos produtos alimentares, os quais passam a ser quantificados com base na quantidade adicionada ao produto, em substituição da usual determinação da quantidade residual. Como exemplo, o limite máximo permitido de nitritos em produtos cárneos é 150 mg/kg (150 ppm).

### I.2.1.5 – Fisiologia

A presença de nitratos e nitritos nos sistemas fisiológicos dos mamíferos deve-se não só à sua ingestão pela via alimentar mas também à sua produção endógena. A química destes iões no ambiente fisiológico encontra-se fortemente relacionada com o metabolismo do monóxido de azoto (NO – geralmente designado por óxido nítrico) sendo que, actualmente, a relação entre estas três espécies da família NOx tem sido alvo de pesquisa intensiva, revistas por Hord *et al.* (2009) e Lundberg *et al.* (2009).

A acção do óxido nítrico, é preponderante numa vasta série de processos fisiológicos e, consequentemente, encontra-se igualmente envolvida na patofisiologia de diversas doenças humanas. Para além de participar nos processos de neurotransmissão, o NO encontra-se envolvido na regulação das funções cardiovasculares e na modelação das respostas inflamatórias. Assim, a desregulação da sua homeostase poderá ter implicações patológicas do foro infeccioso e neurodegenerativo como, por exemplo, doença pulmonar aguda, aterosclerose e choque séptico (Eiserich *et al.*, 1998; Dejan *et al.*, 2004).

Atendendo ao curto tempo de meia vida característico do NO, a sua formação endógena é determinada de forma indirecta através da quantificação dos seus metabolitos estáveis, o nitrato e o nitrito (Sun *et al.*, 2003; Dejan *et al.*, 2004; Correia *et al.*, 2010). Porém, as concentrações de nitrato no plasma não apresentam variações significativas no decurso de episódios de stress nitrosativo, sendo ainda largamente afectadas pelas quantidades ingeridas e pela função renal de cada indivíduo (Dejan *et al.*, 2004).

Consequentemente, o diagnóstico e/ou monitorização de processos infecciosos ou inflamatórios em pacientes é realizado através da quantificação das concentrações de nitrito no plasma e/ou na urina (Ellis *et al.*, 1998). Os valores de referência reportados na literatura para nitrito basal no plasma são bastante divergentes, provavelmente devido a variações na amostragem e processamento das amostras de sangue e a limitações dos métodos analíticos empregues, os quais não permitem uma medição precisa dos nitritos em amostras complexas. Por esta razão, Dejan *et al.* (2005) conceberam uma metodologia experimental que previne a redução/oxidação do nitrito, utilizando uma solução oxidante de hemoglobina com ferricianeto. De acordo com estes autores a concentração de nitrito no plasma encontra-se na gama dos nanomolar ( $\approx 100\text{nM}$ ). Nos últimos anos, o papel que o próprio nitrito desempenha na sinalização intracelular dos mamíferos tem vindo a ser reconhecido (Dejan *et al.*, 2004; Bryan *et al.*, 2005) com a consequente emergência da possível administração terapêutica de nitratos e nitritos (Hord *et al.*, 2009; Lundberg *et al.*, 2009). Atendendo às actuais tendências acima referidas, a monitorização destes aniões em sistemas fisiológicos é, sem dúvida, relevante.

### **1.2.2 – Biossensores Enzimáticos Para a Quantificação de Nitritos**

A concentração total de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  é normalmente determinada com a redução prévia dos nitratos a nitritos por processos quer enzimáticos (com recurso, por exemplo, à redutase do nitrito) quer inorgânicos (com colunas de cobre e/ou cádmio). Esta estratégia é também aplicada na determinação das espécies individuais, por subtracção do teor de nitrito (quantificado em amostras não reduzidas) ao valor total de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  (Dutt & Davis, 2002; Sun *et al.*, 2003).

Exceptuando a espectrofotometria de UV/Vis (reacção de Griess), os numerosos métodos analíticos propostos para a quantificação de nitrito envolvem técnicas sofisticadas e centralizadas como é o caso da cromatografia iónica, polarografia, electroforese capilar, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa ou espectrofotometria de fluorescência. Contudo, a maioria destes métodos demonstraram possuir limitações importantes, nomeadamente no que respeita à necessidade de pré-tratamento das amostras, susceptibilidade a interferências de matriz, limites de detecção insuficientes, tempos de análise demasiado longos e falta de portabilidade. Atendendo à profusão e diversidade dos métodos analíticos propostos na literatura para a determinação de nitritos, a sua descrição, mesmo que sumária, tornar-se-ia demasiado extensa. Porém, existem diversos artigos de revisão com informação detalhada disponíveis para consulta (Ellis *et al.*, 1998; Moorcroft *et al.*, 2001; Dutt & Davis, 2002; Nussler *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003; Tsikas, 2005, 2007; Pelletier *et al.*, 2006; Bryan & Grisham, 2007; Helmke & Duncan, 2007).

As restrições impostas pela utilização de métodos clássicos de análise conduziram ao desenvolvimento de novas ferramentas analíticas: os biossensores enzimáticos de nitritos. Como consequência directa da aplicação deste novo tipo de dispositivos observou-se, nos últimos 15 anos, um grande desenvolvimento na análise de nitritos, resultante, essencialmente, da utilização de enzimas redutoras de nitrito altamente selectivas, activas e estáveis, isoladas a partir de fontes bacterianas. Para além de cumprirem com os requisitos de sensibilidade e selectividade da resposta analítica, os biossensores deverão cumprir ainda com as exigências clássicas de produção e aplicação massivas, nomeadamente facilidade e baixo custo de produção miniaturizada, indispensáveis na conversão de um protocolo laboratorial longo e elaborado numa tarefa simples e de rápida execução, preferencialmente *in situ*. Mais, este tipo de ferramentas analíticas, livres de reagentes, torna os biossensores para determinação de nitritos numa alternativa mais sustentável do ponto de vista ambiental.

Os biossensores enzimáticos capazes de realizar a quantificação de nitritos poderão ser classificados de acordo com o método de transdução de sinal empregue (maioritariamente electroquímico), com o tipo de enzima que possuem (específica ou inespecífica) e com o tipo de resposta fornecido (mediada ou directa). A revisão bibliográfica dos diversos tipos de dispositivos propostos será apresentada em seguida.

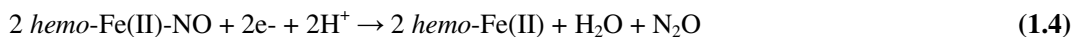
#### **I.2.2.1 – Biossensores Amperométricos e/ou Voltamétricos Baseados em Proteínas Inespecíficas para Determinação de Nitritos**

A mioglobina (Mb) e a hemoglobina (Hb) são proteínas cuja principal função consiste na ligação e transporte de oxigénio molecular (O<sub>2</sub>). A Hb existe nos eritrócitos de numerosos vertebrados e invertebrados onde se combina com o O<sub>2</sub> de forma reversível e o transporta para as células (Giardina *et al.*, 1995; Vicente & Smith, 2001). A Mb encontra-se maioritariamente nos tecidos musculares onde funciona como sistema de armazenamento intracelular de oxigénio (Ishimori, 2001).

Dada a sua elevada disponibilidade, a Mb proveniente de coração de cavalo e a Hb de sangue bovino são frequentemente utilizadas como proteínas modelo na avaliação de novos materiais de imobilização para a construção de biossensores electroquímicos. Assim, a grande maioria dos trabalhos descritos tem por objectivo a detecção de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) através de uma resposta electroquímica directa. A capacidade de detecção de nitritos que estes bioelectrodos apresentam foi considerada pela maioria dos autores como um a actividade catalítica secundária, sendo muitas vezes descrita de forma exígua. Outras proteínas utilizadas com o mesmo propósito, embora com menor frequência, são a Catalase (Cat) de fígado bovino e a peroxidase de rábano (HRP- *horseradish peroxidase*) (Wu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). O mecanismo proposto para a actividade catalítica observada com nitrito neste tipo de biossensor considera que, na realidade, a espécie que interage com o centro activo das proteínas é o óxido nítrico, gerado pela reacção de desproporcionação do nitrito (eq. 1.1) (Barley & Meyer, 1986; Younathan *et al.*, 1992).

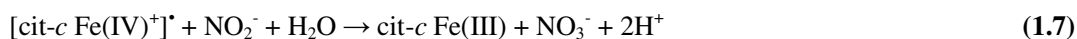
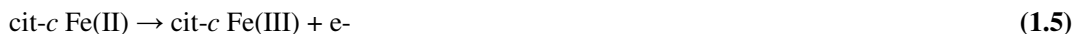


A grande maioria das proteínas hémicas possui a capacidade para ligar e eventualmente reagir com o NO (Cooper, 1999). A forma dos voltamogramas cíclicos obtidos pela acção das proteínas imobilizadas, na presença ou ausência de nitrito, pode ser explicada através do mecanismo actualmente aceite para a redução bioelectrocatalítica do NO, e que pode ser descrito pela seguinte sequência de equações químicas:



Um sistema reversível de dois picos localizado na gama 0.08–0.12 V *vs* NHE é atribuído ao par redox *hemo*-Fe(III)/Fe(II) (eq. 1.2). Quando o NO se liga ao *hemo* ferroso (eq. 1.3) surge um segundo pico de redução, irreversível, entre -0,45V e -0,72V *vs* NHE (eq. 1.4) o qual apresenta comportamento catalítico. O elevado potencial negativo a que surgem as correntes catalíticas obriga à remoção prévia de oxigénio nos sistemas analisados. Contudo, Zhao *et al.* (2008) e Sun *et al.* (2009) detectaram o desenvolvimento de correntes catalíticas associadas ao pico de redução Mb-Fe(III) (eq. 1.2), e Liu *et al.* (2003) mencionam um comportamento semelhante para a Hb na presença de baixas concentrações de nitrito. Porém, nenhum destes autores propôs qualquer explicação para o facto. Blair *et al.* (2006) publicaram uma extensa revisão dos mecanismos alternativos propostos para a redução electrocatalítica de óxidos de azoto (NO<sub>x</sub>) levada a cabo quer por proteínas hémicas quer por compostos modelo.

Recentemente foram também reportados biossensores amperométricos para a determinação de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> que utilizam o citocromo-*c* (cit-*c*) de coração de cavalo como elemento de reconhecimento biológico (Geng *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Esses sensores baseiam-se na oxidação do nitrito a nitrato conduzida por uma forma altamente reactiva da proteína denominada catião- $\pi$ , de acordo com o seguinte esquema reaccional:



O principal inconveniente desta estratégia é o elevado potencial de trabalho, necessário à formação da espécie radicalar reactiva (ca. 0,6 V *vs* SCE) e à monitorização da reacção catalítica (> 0,7 V *vs* SCE) que eventualmente potenciam reacções de oxidação inespecíficas em amostras reais (Geng *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

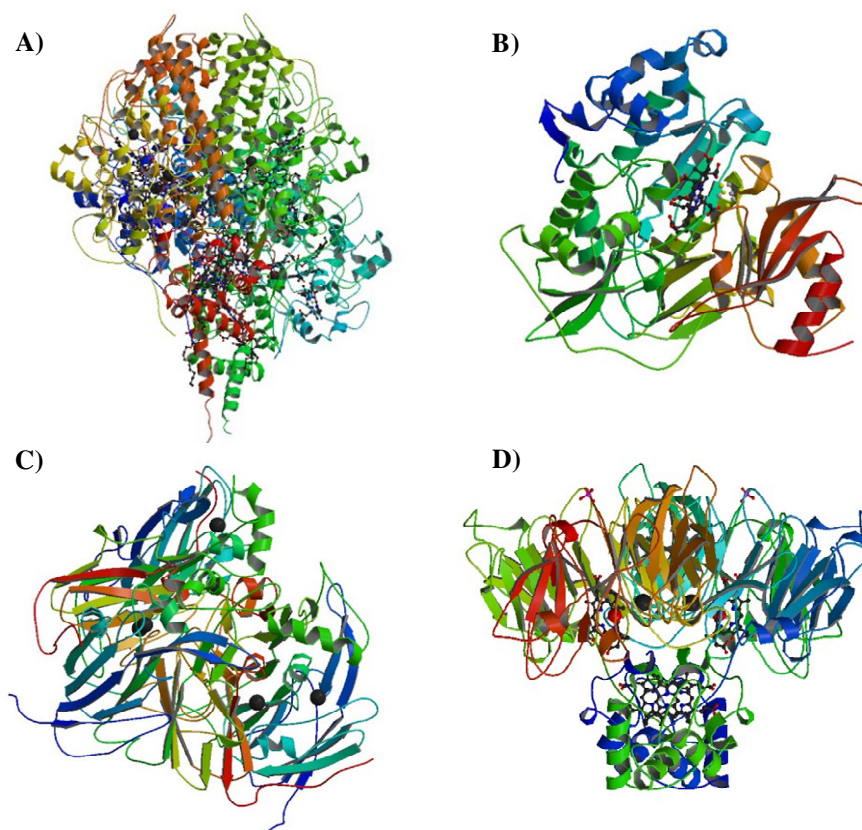
Um conceito diferente foi proposto recentemente por Chen *et al.* (2008). Estes autores conceberam um sistema de transdução complexo que associa as duas enzimas dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> HRP e Cat, de forma sequencial. Na presença de nitrito, a actividade de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela Cat é inibida, aumentando assim a quantidade de peróxido disponível para ser reduzido pela HRP ligada ao eléctrodo.

A inespecificidade destas proteínas hémicas é contudo, a principal desvantagem dos sistemas deste tipo, dado que condiciona fortemente a selectividade da determinação.

Atendendo à existência de enzimas muito mais selectivas, as proteínas apresentadas nesta secção não são, de todo, recomendadas para a construção de um biossensor selectivo de nitritos.

#### I.2.2.2 – Biossensores Amperométricos e/ou Voltamétricos Baseados em Redutases do Nitrito

As redutases do nitrito (NiRs) são candidatas inatas para desempenhar a função de elemento de reconhecimento biológico em biossensores de nitrito. Na figura I.1 encontram-se representadas as estruturas tridimensionais de enzimas pertencentes às quatro classes de NiRs reconhecidas até ao momento, agrupadas de acordo com o produto da reacção que catalisam e com o tipo de co-factores que possuem.



**Fig.I.1:** Estrutura tridimensional de algumas redutases do nitrito. **A)** redutase do nitrito multihémica *c* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, complexo NrfA<sub>4</sub>NrfH<sub>2</sub> (Rodrigues *et al.*, 2006; PDB- 2J7A); **B)** redutase do nitrito de espinafre (Swamy *et al.*, 2005; PDB-2AKJ); **C)** redutase do nitrito de cobre proveniente de *Achromobacter cycloclastes*, trímero (Adman *et al.*, 1995; PDB-1NIE); **D)** citocromo *cd*<sub>1</sub> de *Pseudomonas aeruginosa*, dímero (Nurizzo *et al.*, 1997; PDB-1NiR).



A caracterização estrutural, reactividade e função biológica deste tipo de enzimas encontra-se revista por diversos autores tais como Richardson & Watmough (1999), Moura & Moura (2001) e Einsle & Kroneck (2004), entre outros.

#### Redutases Produtoras de Amónia:

A reacção de redução de nitrito em seis electrões, conducente à formação de amónia (eq. 1.8) pode ser catalizada por duas NiR.



As citocromo-*c* redutases do nitrito (*ccNiRs*) dissimilativas isoladas de bactérias redutoras de sulfato ou enxofre são enzimas multihémicas envolvidas num processo respiratório que representa um ramo importante do ciclo biológico do azoto. As *ccNiRs* podem ainda utilizar o óxido nítrico (NO) e a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) como substratos (Costa *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 2010A). São normalmente isoladas da membrana periplasmática sob a forma de multímeros de elevada massa molecular, os quais englobam as subunidades NrfA (61 kDa) e NrfH (19 kDa) (Almeida *et al.*, 2003) numa estequiometria NrfA<sub>4</sub>NrfH<sub>2</sub> (fig. I.1A) (Rodrigues *et al.*, 2006). O pequeno polipéptido hidrófobo NrfH é o doador electrónico fisiológico do NrfA. Este último alberga cinco *hemos* por monómero acondicionados de forma compacta, permitindo velocidades de transferência electrónica intramolecular elevadas. Com excepção do centro activo, que possui uma lisina como quinto ligando de coordenação e a posição axial disponível para ligar o substrato, todos os restantes *hemos* são do tipo *c* hexacoordenados (Einsle *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2006).

O outro género de NiRs produtoras de amónia pertence à família das redutases do nitrito dependentes de ferredoxina, usualmente isoladas de organismos fotossintéticos tais como plantas, algas e cianobactérias. Estas enzimas assimilativas são constituídas por uma única cadeia polipeptídica (60-65 kDa) composta por três domínios envolvidos em torno de dois grupos prostéticos, um sirohemo e um centro [4Fe4S], ligados através de uma ligação persulfureto, sendo que o nitrito se liga ao sirohemo (fig. I.1B) (Kuznetsova *et al.*, 2004; Swamy *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2010).

### Redutases Produtoras de Óxido Nítrico:

Dois géneros de NiRs dissimilativas catalisam a redução nitrito a óxido nítrico (eq. 1.9), a qual envolve apenas um electrão. São conhecidas por redutases do nitrito de cobre (CuNiRs) e redutases do nitrito citocromo-*cd*<sub>1</sub> (*cd*<sub>1</sub>NiRs).



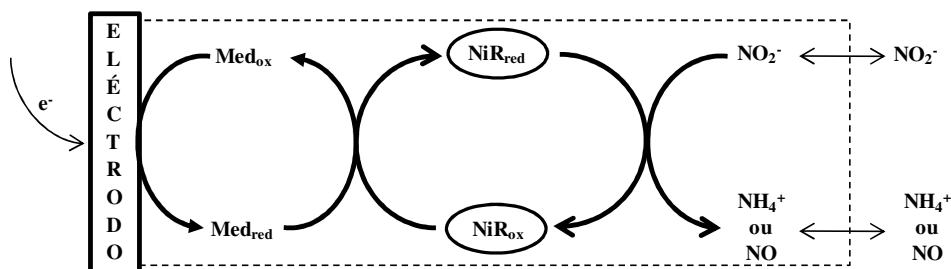
As CuNiRs (fig. I.1C) são proteínas homotriméricas (3 x 37kDa) contendo dois átomos de cobre em cada uma das subunidades. O centro de cobre do tipo-I encontra-se envolvido na transferência electrónica enquanto o átomo do tipo-II constitui o centro catalítico (Kukimoto *et al.*, 1994; Adman *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1997).

As *cd*<sub>1</sub>NiRs (fig. I.1D) são enzimas solúveis e homodiméricas (2x 60 kDa) onde cada subunidade contém um *hemo* do tipo-*c*, que funciona como aceitador electrónico, e um *hemo* do tipo-*d*<sub>1</sub> que actua como centro catalítico (Silvestrini *et al.*, 1990; Jafferji *et al.*, 2000). Estas proteínas serão alvo de uma descrição detalhada na secção I.2.4.

#### I.2.2.2.1 – Electroquímica Mediada

A implementação de um sistema biossensorial não consiste apenas em encontrar a enzima apropriada e ligá-la a uma superfície transdutora. Frequentemente, o maior desafio na concepção de um biossensor electroquímico consiste na obtenção de uma comunicação electrónica eficiente entre as proteínas e os eléctrodos.

No que se refere a biossensores de nitrito, a grande maioria das propostas apresentadas até ao momento recorre à utilização de mediadores redox, os quais apresentam uma resposta electroquímica rápida e reversível, sendo simultaneamente capazes de transferir electrões de, e para, os centros redox proteicos, de acordo com o esquema apresentado na figura I.2.



**Fig.I.2:** Representação esquemática dos biossensores com sinal produzido via electroquímica mediada e transdução amperométrica e/ou voltamétrica.

#### I.2.2.2.1.1 – Mediadores Artificiais

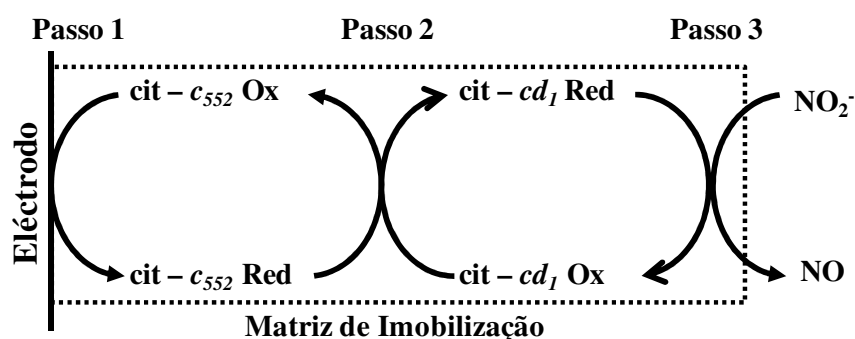
A electroquímica mediada de diferentes NiRs encontra-se profusamente descrita na bibliografia, com uma vasta gama de transportadores electrónicos artificiais, imobilizados ou em solução, a serem testados com vista ao desenvolvimento de biossensores de nitrito (Strehlitz *et al.*, 1994, 1996; Quan *et al.*, 2006). Embora as NiRs apresentem a capacidade de aceitar electrões de uma vasta gama de mediadores redox, são utilizados preferencialmente doadores electrónicos com potenciais redox bastante negativos, essencialmente compostos da família dos viologénios. Tal facto ocorre devido ao aumento da *performance* analítica conferida pelo recurso a estes compostos (Wu *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2004; Quan *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007). Contudo, os elevados potenciais de polarização requeridos potenciam a ocorrência de reacções inespecíficas, principalmente com o  $O_2$ , causando interferências no processo analítico. É aliás, por este motivo que os biossensores baseados em redutases do nitrito são quase exclusivamente dispositivos anaeróbios. Sempre que possível, é aconselhável a selecção de mediadores com potenciais de redução mais elevados. As fenazinas (Strehlitz *et al.*, 1994, 1996; Silva *et al.*, 2006), safraninas (Strehlitz *et al.*, 1996) e antroquinonas (Chen *et al.*, 2007) são exemplos de mediadores alternativos encontrados em biossensores baseados em NiRs.

#### I.2.2.2.1.2 – Mediadores Fisiológicos

A construção de biossensores com resposta mediada, baseados na interacção de NiRs com os seus parceiros fisiológicos naturais é uma tendência recente (Astier *et al.*, 2005; Tepper, 2010). Este tipo de mediação poderá vir a demonstrar-se vantajosa relativamente à utilização de mediadores artificiais, no sentido em que simula de forma mais fiel os processos de transferência electrónica que ocorrem *in vivo*.

Ao evitar o recurso a mediadores que são frequentemente tóxicos e catalisadores genéricos, a aplicação deste método torna-se mais sustentável do ponto de vista ambiental e simultaneamente melhora os limites de detecção e a selectividade dos dispositivos biossensoriais (Lojou *et al.*, 2003; Astier *et al.*, 2005; Tepper, 2010).

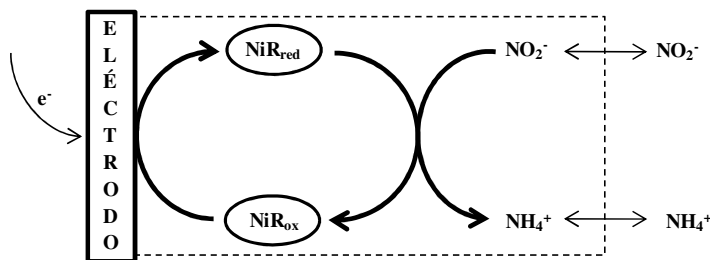
Neste trabalho, será apresentado e discutido um biossensor para determinação de nitritos baseado neste conceito (fig. I.3), recorrendo à  $cd_1NiR$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* como elemento de reconhecimento biológico e ao seu parceiro fisiológico, o citocromo- $c_{552}$  (cit- $c_{552}$ ) como mediador electroquímico.



**Fig. I.3:** Esquema reaccional para o biossensor de nitritos baseado na actividade da  $cd_1NiR$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, com recurso ao cit- $c_{552}$  proveniente da mesma fonte bacteriana como mediador.

#### I.2.2.2.2 – Electroquímica Directa

Existem também biossensores de nitrito baseados na electroquímica directa (DET-*direct electron transfer*) entre as enzimas e os eléctrodos (Scharf *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 2010B; 2010C). A configuração genérica destes dispositivos encontra-se representada na figura I.4.



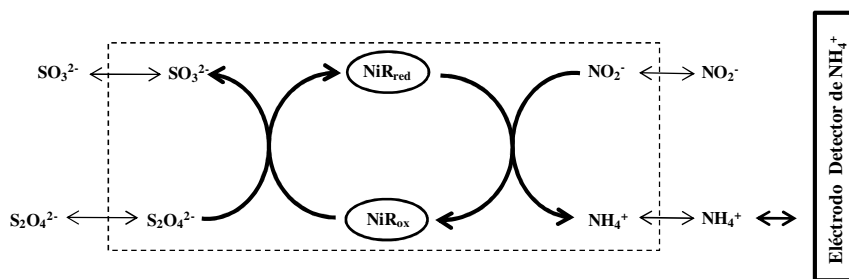
**Fig. I.4:** Representação esquemática dos biossensores com sinal produzido via electroquímica directa e transdução amperométrica e/ou voltamétrica.

Os pré-requisitos para alcançar de forma eficiente uma reacção de transferência electrónica heterogénea incluem a correcta orientação da proteína na superfície do eléctrodo e uma distância suficientemente curta entre o centro redox e a interface com o eléctrodo. O potencial operacional de dispositivos baseados em DET encontra-se directamente relacionado com o pontencial redox das enzimas aplicadas, facto que contribui para um aumento da selectividade e redução das reacções interferentes. A própria construção do biossensor é facilitada, visto que a quantidade de reagentes e etapas de construção são substancialmente reduzidos (Scharf *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 2010B; 2010C).

### I.2.2.3 – Biossensores Não-Amperométricos

#### I.2.2.3.1 – Detecção Potenciométrica

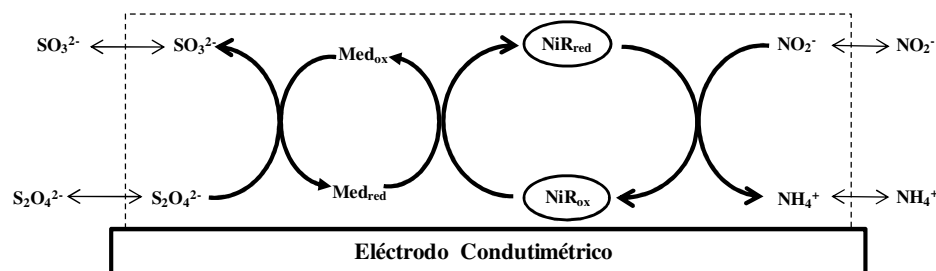
Um trabalho pioneiro desenvolvido por Kiang *et al.* (1975) reporta o primeiro biossensor de nitrito baseado na actividade de uma redutase do nitrito. Nesse trabalho, uma NiR sirohémica extraída das folhas de espinafre foi incorporada numa matriz polimérica e, com recurso a viologénio de metilo (reduzido com ditionito) como mediador, procedeu-se à medição, por via potenciométrica, da amónia produzida pela redução de nitrito (Kiang *et al.*, 1975). Na figura I.5 apresenta-se a representação esquemática do dispositivo proposto por estes autores.



**Fig. I.5:** Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução potenciométrica.

#### I.2.2.3.2 – Detecção Condutimétrica

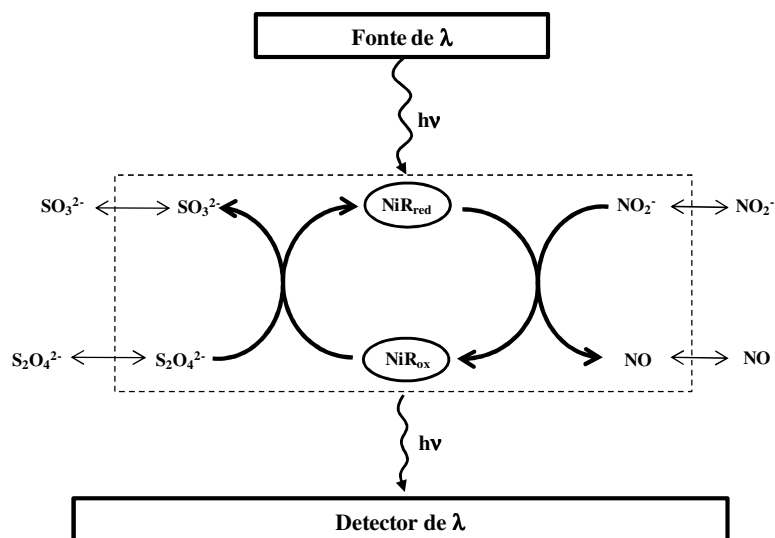
Um biossensor condutimétrico para a determinação de nitritos foi desenvolvido por Zhang *et al.* (2009) num trabalho de colaboração com o nosso grupo. Na figura I.6 encontra-se representado o princípio de funcionamento do dispositivo.



**Fig. I.6:** Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução condutimétrica.

### I.2.2.3.3 – Detecção Óptica

Trabalhos análogos publicados por Ferreti *et al.* (2000) e por Rosa *et al.* (2002) sugerem a transdução por via óptica em biossensores enzimáticos de nitrito. Em ambos os casos as medições baseiam-se na alteração da intensidade da banda de absorção atribuída ao centro catalítico da NiR utilizada. O esquema representativo dos sensores desenvolvidos com esta metodologia apresenta-se na figura I.7.



**Fig. I.7:** Representação esquemática do biossensor de nitrito com transdução óptica.

A tabela I.1 apresenta, de forma resumida, as principais características e parâmetros analíticos de diversos biossensores enzimáticos para quantificação de nitritos, englobando os trabalhos mais recentes e/ou representativos de cada tipo de dispositivo.

**Tabela I.1:** Descrição e parâmetros analíticos de biossensores para a determinação de nitrito baseados em NiRs como elementos de reconhecimento biológico.(N.A.- não aplicável; N.D.- não determinado; MET – transferência electrónica mediada; DET – transferência electrónica directa).

Enzima	Origem	Preparação do Sensor	Transdução	Transferência Electrónica	Gama de Linearidade	Limite de Detecção	Sensibilidade	Ref.
NiR sirohémica	folha de espinafre	Enzima + BSA + glutaraldeído	Potenciométrica	N.A.	0,1-50 mM	N.D.	N.D.	Kiang <i>et al.</i> , 1975
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	GC/ deposição de enzima + poliacrilamida (mediador em solução) GC/ deposição de enzima + poliacrilamida	Voltamétrica	MET (viologénio de metilo) DET	até 200µM	N.D.	N.D.	Scharf <i>et al.</i> , 1995
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	GC/ dispersão de mistura de poli(pirroló-viologénio) + enzima seguida de electropolimerização	Voltamétrica	MET (poli(pirroló-viologénio))	5,4-43,4 µM	5,4 µM	1 721 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	Silva <i>et al.</i> , 2004
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de Nafion + enzima / incorporação do mediador	Voltamétrica	MET (viologénio de metilo)	75-800 µM	60 µM	445 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	Almeida <i>et al.</i> , 2007
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de [ZnCr-AQS]LHD + enzima / ligação covalente com vapor de glutaraldeído	Amperométrica	MET (AQS)	0,015-2,350 µM	4 nM	1 824 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	Chen <i>et al.</i> , 2007
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	Ouro/ deposição de Nafion + enzima + mediador + glicerol + BSA/ ligação covalente com glutaraldeído	Condutimétrica	MET (viologénio de metilo)	0,2-120 µM	0,05 µM	0,194 µS/µM	Zhang <i>et al.</i> , 2009
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	Grafite pirolítica/ deposição de EETMS sol / deposição de enzima	Amperométrica	DET	0,25-50 µM	120 nM	430 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	Silveira <i>et al.</i> , 2010B
ccNiR	<i>D. desulfuricans</i>	Grafite/ deposição de dispersão de nanotubos de carbono “single-walled” / deposição de enzima	Voltamétrica	DET	até 150 µM	N.D.	2 400 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	Silveira <i>et al.</i> , 2010C

Tabela I.1: Continuação.

Enzima	Origem	Preparação do Sensor	Transdução	Transferência Electrónica	Gama de Linearidade	Limite de Detecção	Sensibilidade	Ref.
ccNiR	<i>S. deleyianum</i>	Compósito de grafite + mediador/ deposição de enzima + membrana de hidrogel de poli(carbamoil sulfonato).	Amperométrica	MET (fenosafranina)	até 250 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	446,5 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$	Strehlitz <i>et al.</i> , 1996
cd <sub>7</sub> NiR	<i>P. denitrificans</i>	Grafite / aprisionamento da enzima com membrana de diálise (mediador em solução).	Amperométrica	MET (1-metoxi PMS)	4,35-65,2 $\mu\text{M}$	N.D.	N.D.	Strehlitz <i>et al.</i> , 1994
cd <sub>7</sub> NiR	<i>P. denitrificans</i>	Grafite / aprisionamento da enzima com membrana de diálise (mediador em solução)	Amperométrica	MET (1-metoxi PMS)	até 750 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	33 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$	Strehlitz <i>et al.</i> , 1994
cd <sub>7</sub> NiR	<i>P. pantotrophus</i>	Enzima encorporada em monólitos de TEOS produzidos por sol-gel.	Óptica	N.A.	0,075-1,250 $\mu\text{M}$	0,075 $\mu\text{M}$	N.D.	Ferreti <i>et al.</i> , 2000
cd <sub>7</sub> NiR	<i>P. pantotrophus</i>	Enzima encapsulada em grânulos de isotiocianato de poro controlado.	Óptica	N.A.	0-4 mM	0,93 $\mu\text{M}$	19,5 $\text{nM}^{-1}$	Rosa <i>et al.</i> , 2002
CuNiR	<i>R. sphaeroides</i>	GC/ electropolimerização de PPB / deposição de enzima + PBV	Amperométrica	MET (PPB)	até 50 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	789 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$	Wu <i>et al.</i> , 1997
CuNiR	<i>R. sphaeroides</i>	GC/ deposição de PVA + mediador + enzima/ deposição de PAH/ deposição de poliuretano hidrófilo.	Voltamétrica	MET (viologénio de metilo)	1,5-260 $\mu\text{M}$	1,5 $\mu\text{M}$	170 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$	Quan <i>et al.</i> , 2006
CuNiR	<i>A. faecalis</i>	Ouro/ enzima aprisionada com membrana de diálise (mediador em solução).	Amperométrica	MET (1-metoxi PMS)	0-22 $\mu\text{M}$	0,22 $\mu\text{M}$	N.D.	Sasaki <i>et al.</i> , 1998
CuNiR	<i>A. faecalis</i>	Ouro/ imersão em solução de hexapeptidos de cisteína (enzima e mediador em solução)	Voltamétrica	MET (pseudoazurina) MET (hexamina de ruténio)	200-1 500 $\mu\text{M}$ 1-100 $\mu\text{M}$	N.D.	N.D.	Astier <i>et al.</i> , 2005



## I.2.3 – Tecnologias Emergentes em Biossensores

### I.2.3.1 – Monocamadas Automontadas

#### I.2.3.1.1 – Aspectos Gerais

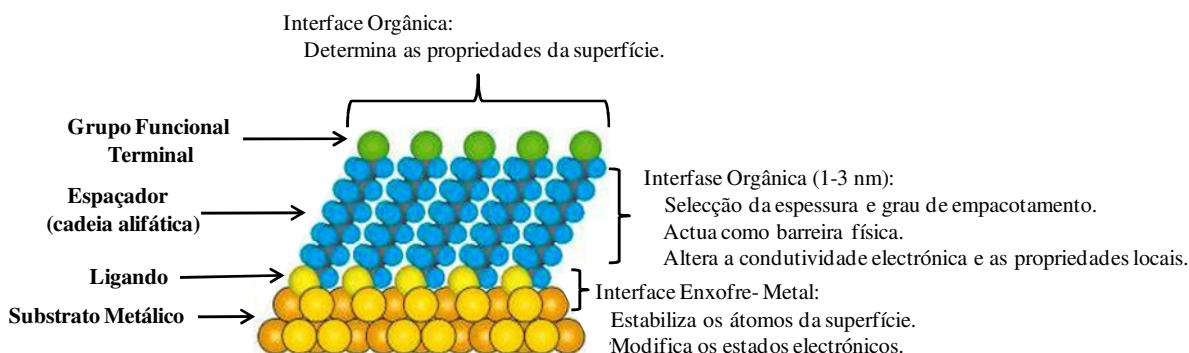
O termo monocamadas automontadas (SAMs – *Self Assembled Monolayers*) aplica-se a estruturas produzidas pela formação espontânea de monocamadas organizadas de compostos orgânicos em superfícies sólidas, a partir de soluções ou da fase de vapor.

A formação deste tipo de estruturas foi demonstrada pela primeira vez em 1946 por Bigelow *et al.* para alquilaminas em platina e, após alguns estudos publicados na década de 80 do século passado, as atenções da comunidade científica centraram-se no estudo de SAMs de alcanotióis e outros compostos com grupos terminais de enxofre (dissulfetos e sulfetos) em superfícies metálicas de Ag, Cu, Pt, Fe e Ni, e semicondutoras (GaAs), mas sempre com particular ênfase no Au. Os alcanotióis não são, contudo, indicados para a formação de SAMs em todos os tipos de superfície. Para superfícies hidroxiladas, como é o caso dos silicatos, aluminatos, mica e outros, é comum serem usadas SAMs de organosilanos; SAMs de ácidos gordos em óxidos metálicos, e de hidrocarbonetos em silício, têm sido também sistemas amplamente estudados.

As SAMs combinam as vantagens do UHV (*Ultrahigh Vacuum*) e do método de Langmuir-Blodgett para a preparação de filmes finos, não requerendo porém a utilização dos equipamentos específicos (e dispendiosos) necessários para a realização destas técnicas. Tal como nos filmes preparados por UHV, o método de preparação de SAMs é simples, existindo uma forte interacção (quimisorção) entre o adsorvato e o substrato. Por outro lado, e tal como nos filmes Langmuir-Blodgett, as interacções entre cadeias do adsorvato (envolvendo forças de van der Waals e interacções de carácter hidrófobo) garantem um empacotamento eficiente da monocamada, cuja estabilidade é directamente proporcional ao comprimento das cadeias alifáticas.

Consideradas a forma mais elementar de filme orgânico ultrafino, as SAMs são, elas próprias, nanoestruturas, com uma espessura que varia tipicamente entre 1-3 nm, e as suas propriedades intrínsecas conferem-lhes uma vasta gama de aplicações.

Uma parte substancial da versatilidade deste tipo de estruturas advém da facilidade com que podem ser funcionalizadas, permitindo o controlo de diversos parâmetros da superfície modificada. Assim, através da composição da cadeia alifática (comprimento, substituintes), é possível seleccionar o nível de empacotamento e, a natureza química do grupo terminal confere selectividade quanto ao tipo e orientação dos compostos com os quais a estrutura irá interagir. No diagrama da figura I.8 encontram-se representadas as diferentes componentes e características por elas conferidas, da estrutura de uma SAM.



**Fig. I.8:** Diagrama esquemático de uma SAM ideal, formada por um alcanotiol numa superfície monocristalina de Au (111) (Love *et al.*, 2005).

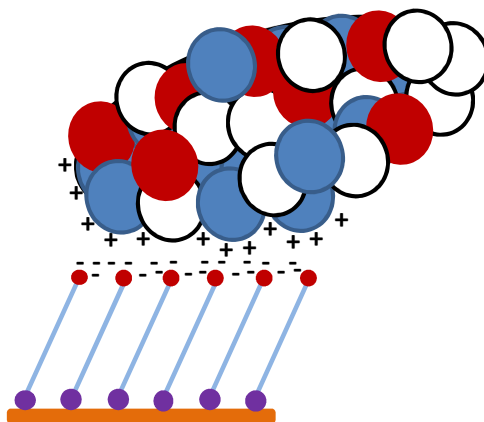
Uma outra característica deveras importante consiste na possibilidade de se formarem em objectos de todos os tamanhos e formas (e não apenas em superfícies planas) e a capacidade de funcionarem como auxiliares na estabilização e funcionalização de nano-objectos (nanopartículas, nanotubos, nanofios). Por fim, é possível proceder à sua monitorização, através das propriedades electrónicas (electroquímica) e ópticas (índice de refacção local, frequência de superfície) das estruturas metálicas.

As características acima mencionadas tornam o estudo da SAMs particularmente promissor nas áreas de prevenção de corrosão, fabrico de nanodispositivos para aplicação em sistemas informáticos, implantes médicos e sistemas de *drug delivery* e, claro, na construção de sensores (Love *et al.*, 2005; Vericat *et al.*, 2005).

### I.2.3.1.2 – Aplicação em Biossensores

A aplicação de SAMs em dispositivos biossensoriais contempla, não só, a construção de biossensores enzimáticos, mas também biossensores de ácidos nucleicos (baseados na hibridação de DNA) e imunossensores (reconhecimento anticorpo-antigene).

A modificação de SAMs através da imobilização de elementos de reconhecimento biológico (ERB), com o objectivo de construir biossensores, pode ser atingida através de diversas estratégias, de acordo com o dispositivo que se pretende desenvolver e o tipo de biomolécula em causa. A forma mais simples de modificação destas estruturas consiste na adsorção física, baseada em interações electrostáticas entre cargas presentes na superfície de uma SAM contendo grupos terminais iónicos e a biomolécula, de acordo com a distribuição superficial de cargas desta última. A correcta selecção do tipo de SAM e das condições experimentais (essencialmente pH) em que a adsorção ocorre pode, inclusivamente, permitir modular a orientação espacial das biomoléculas, potenciando assim um melhor desempenho do biossensor (figura I.9).

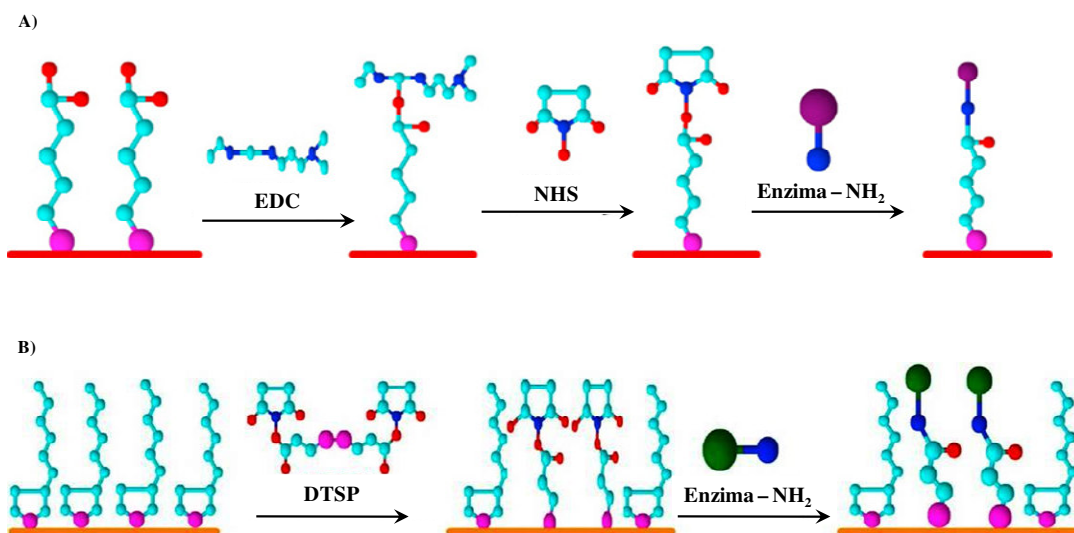


**Fig. I.9:** Diagrama representativo da adsorção de uma proteína a uma SAM, por via de interacção electrostática.

A elevada estabilidade da ligação entre SAM e ERB conseguida através da utilização de activadores químicos tem vindo a demonstrar um elevado potencial para o desenvolvimento de dispositivos comerciais. De entre os numerosos métodos de activação constantes da literatura, o mais generalizado consiste na utilização conjunta da *N*-etil-*N*-(3- dimetilamonio)propil) carbodiimida e da *N*-hidroxisucínimida, vulgarmente designado por EDC/NHS (fig. I.10A).

Este método demonstrou ser particularmente apropriado na ligação de proteínas a SAMs com grupos terminais carboxilo os quais, mediante activação, formam ligações peptídicas com grupos amina presentes na superfície da biomolécula, essencialmente provenientes de resíduos de Arg e Lys. O recurso á imobilização através de ligações cruzadas (do inglês: *cross-link*) é também uma abordagem usual para a modificação de SAMs com ERBs. Neste contexto, o recurso a agentes de ligação tais como o gluteraldeído permitem a formação de sistemas estáveis porém, as ligações assim conseguidas não são selectivas do ponto de vista da orientação espacial da biomolécula e a deposição do ERB em monocamada também não é assegurada.

A modificação de SAMs mediante processos de troca permite a funcionalização de superfícies e a criação de SAMs mistas. A ligação das biomoléculas através destes processos pode ser conseguida por via directa, inserindo um composto previamente ligado ao ERB numa SAM pré-estabelecida, ou por via indirecta, substituindo parcialmente a composição da SAM com agentes activadores e ligando o ERB em seguida (fig. I.10B) (Arya *et al.*, 2009; Fransconi *et al.*, 2010).



**Fig. I.10:** Reacções de ligação de ERBs a SAMs (Arya *et al.*, 2009). **A)** Ligação por activação com EDC/NHS. **B)** Modificação através de um processo de troca com DTSP.

### **I.2.3.2 – Eléctrodos *Screen – Printed* (SPEs - *Screen – Printed Electrodes*)**

#### **I.2.3.2.1 – Importância Estratégica**

A rápida e permanente evolução das sociedades modernas impulsionou significativamente a procura de sensores descartáveis, de baixo custo, altamente precisos e de resposta rápida, para aplicações clínicas e industriais. Adicionalmente, a portabilidade (miniaturização) de tais dispositivos é de importância fundamental, permitindo determinações descentralizadas, que dispensem o recurso às técnicas tradicionais, altamente dispendiosas, que dependem de equipamentos específicos e operadores qualificados como, por exemplo, cromatografia líquida ou gasosa e espectrometria de massa.

A tecnologia *screen-printing*, aplicada ao fabrico de sensores químicos e biossensores, é uma técnica que se encontra, hoje em dia, inteiramente implantada e estabelecida, sendo o exemplo mais proeminente da comercialização deste tipo de dispositivos o biossensor para monitorização pessoal da glucose, utilizado por pacientes com diabetes, a qual representa um mercado anual global estimado em um bilião de dólares americanos.

A produção de sensores de última geração e sistemas portáteis que permitem a análise directa de amostras no seu ambiente natural, deve-se, em grande parte, à incorporação de SPEs nesse tipo de dispositivo. A recente possibilidade de conceber e produzir SPEs de forma rápida e económica, e incorporá-los numa variedade de biossensores altamente sensíveis, aumentou significativamente o grau de interesse a nível industrial, clínico e ambiental, expandindo a possibilidade de implementação de sistemas desenvolvidos em laboratório em aplicações da vida real.

Os SPEs não só apresentam uma excelente relação custo/benefício, como também satisfazem as necessidades de elevada reprodutibilidade e sensibilidade inerentes a um sensor eficiente. A versatilidade dos SPEs é também altamente benéfica para as áreas da investigação. A capacidade de modificar os eléctrodos com facilidade, seleccionando a composição das tintas, a configuração do dispositivo ou através de modificações posteriores, permite a produção de eléctrodos altamente selectivos e finamente calibrados para um determinado analito alvo, sendo que, actualmente, muitos laboratórios de investigação possuem instalações de impressão destinadas á produção de SPEs para aplicação em dispositivos protótipo (Tudorache & Bala, 2007; Barry *et al.*, 2009; Metters *et al.*, 2011).

#### I.2.3.2.2 – Eléctrodos

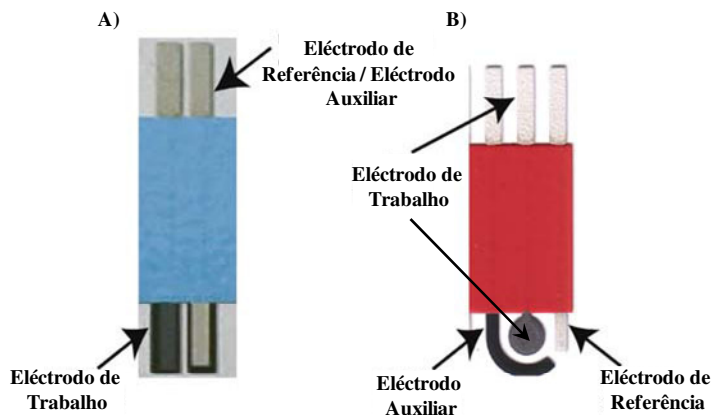
A construção de um SPE para o desenvolvimento de um biossensor deve ter em consideração alguns aspectos fundamentais que influenciam significativamente o desempenho analítico do dispositivo.

A composição do substrato, material de base sobre o qual são impressas as secções funcionais do eléctrodo, que é geralmente cerâmica ou plástico, deverá ser um bom isolante eléctrico e ser quimicamente inerte.

No que respeita às tintas (pastas) utilizadas na impressão, estas devem providenciar contactos eléctricos adequados e fiáveis para interfaces sólido-sólido. De uma forma genérica, são compostas por um agente aglutinante, um agente condutor ou semi-condutor e aditivos funcionalizantes. No caso das pastas condutoras destaca-se claramente as que possuem grafite como elemento condutor, essencialmente devido ao baixo custo de produção (sobretudo quando comparadas com as pastas de Au ou Pt) e às vantagens que este material apresenta a nível de comportamento electroquímico e biocompatibilidade, as quais conferem aumentos significativos a nível de limites de detecção, tempos de resposta, reprodutibilidade, estabilidade, etc. Existem preparações de pasta de carbono disponíveis comercialmente com um diversificado leque de propriedades, nomeadamente viscosidade, condutividade, hidrofobicidade e resistência térmica, as quais deverão ser equacionadas de acordo com o elemento de reconhecimento biológico, analito e condições de análise (matriz) a que o sensor se destina.

Contudo, é também prática comum proceder à modificação das pastas comerciais, com a incorporação de aditivos específicos para determinadas aplicações. Neste capítulo destaca-se a incorporação de mediadores artificiais e, mais recentemente mediadores biológicos e até os próprios elementos de reconhecimento biológico, numa tentativa evidente de produzir sistemas verdadeiramente integrados e de preparação ainda mais simples (passo único). Para esse efeito, têm sido utilizadas com sucesso pastas de carbono contendo grafite sol-gel, as quais reduzem os problemas resultantes de lixiviação dos aditivos e permitem o encapsulamento das biomoléculas, protegendo-as contra a desnaturação provocada pelos processos de preparação dos SPEs, nomeadamente as altas temperaturas e tratamentos mecânicos. A inclusão de aditivos fotopolimerizáveis e também uma abordagem recente que visa atingir um objectivo semelhante. Neste caso, pretende-se modificar o processo de fabrico para que esta ocorra em condições mais suaves, de forma a preservar a actividade do elemento de reconhecimento biológico quando incorporado na pasta (Tudorache & Bala, 2007; Barry *et al.*, 2009; Metters *et al.*, 2011).

Usualmente, os SPEs comerciais apresentam-se em dois tipos de configuração, isto é, sistemas de dois ou três electrodos, de acordo com o esquema apresentado na figura I.11. Salienta-se porém que, tal como foi referido anteriormente, a possibilidade de imprimir electrodos próprios, com configurações distintas, é já uma realidade presente em diversos laboratórios (Tudorache & Bala, 2007; Barry *et al.*, 2009; Metters *et al.*, 2011).



**Fig. I.11:** Configurações usuais de SPEs disponíveis comercialmente (Tudorache & Bala, 2007). **A)** Sistema de dois electrodos. **B)** Sistema de três electrodos.

A produção de *micro-arrays* tem também vindo a ser amplamente explorada. Tal é conseguido pela impressão de uma série (*array*) de microelectrodos ligados em paralelo, com cada uma a funcionar de forma independente. Estes dispositivos permitem usufruir das vantagens dos microelectrodos (melhor resolução temporal e densidade de corrente, queda ohmica e correntes de carga reduzidas e elevada relação entre correntes Faradaica e capacitiva), aumentando significativamente a qualidade da transdução do sinal. Neste tipo de configuração (fig. I.12) a difusão radial sobrepõe-se ao transporte de massa, gerando sinais amplificados em muitas ordens de magnitude.



**Fig. I.12:** Exemplo de um chip (*micro-array*) *screen-printed* com ouro (Mettters *et al.*, 2011).

Este tipo de eléctrodos tem vindo a ser utilizado cada vez com maior frequência em aplicações electroanalíticas pois permite a criação de dispositivos com maior sensibilidade e menor limite de detecção que os SPEs convencionais (Mettters *et al.*, 2011).

#### **I.2.4 – O citocromo- $cd_1$ ( $cd_1NiR$ )**

##### **I.2.4.1 – Ocorrência e Função Biológica**

O citocromo- $cd_1$  ( $cd_1NiR$ ) é uma redutase do nitrito periplasmática existente em diversas bactérias desnitrificantes, entre as quais se destacam a *Pseudomonas aeruginosa* (Pa); *Pseudomonas stutzeri* (Ps), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Mh; anteriormente *Pseudomonas nautica*), *Paracoccus pantotrophus* (Pp; anteriormente *Thiosphaera pantotropha*), *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* e *Ralstonia eutropha* (Brittain *et al.*, 1992; Cutruzzolà, 1999).

Trata-se de uma enzima homodimérica cujo monómero possui dois domínios distintos, cada um ligando um hemo. O *hemo c* transfere electrões provenientes de proteínas doadoras para o centro activo, o *hemo d<sub>1</sub>*, uma dioxoisobacterioclorina com ferro específica desta classe de enzimas (Brittain *et al.*, 1992; Cutruzzolà, 1999).

A função fisiológica da  $cd_1NiR$  consiste na redução em um electrão do nitrito a óxido nítrico (eq. 1.9) no decurso da desnitrificação (Zumft *et al.*, 1988; Cutruzzolà, 1999; Cutruzzolà *et al.*, 2003). Contudo, esta enzima pode também catalisar, *in vitro*, a redução de dois electrões da hidroxilamina a amónia (eq. 1.10) (Allen *et al.*, 2000; van Wonderen *et al.*, 2007) e de quatro electrões do oxigénio molecular a água (eq. 1.11) (Fülöp *et al.*, 1995; Koppenhöfer *et al.*, 2000; Centola *et al.*, 2006).

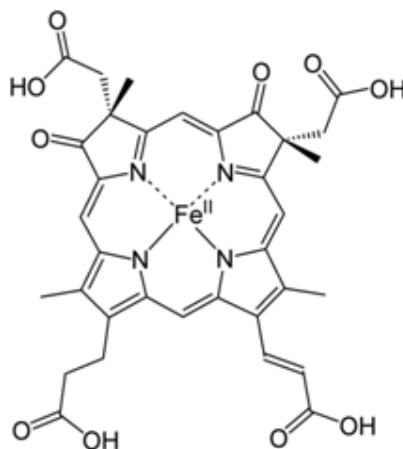




Para além dos substratos acima referidos, o *hemo d<sub>1</sub>* apresenta a capacidade de ligar outros ligandos típicos de *hemos* tais como o monóxido de carbono (CO) (Jjögren *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2001) e o cianeto (CN<sup>-</sup>) (Sun *et al.*, 2002).

#### I.2.4.2 – O *hemo d<sub>1</sub>*

O *hemo d<sub>1</sub>* é uma dioxoisobacteriochlorina com ferro (Wu *et al.*, 1987) que ocorre exclusivamente na *cd<sub>1</sub>NiR*. A sua estrutura (fig. I.13) difere das estruturas dos *hemos* do tipo *b* e *c*, pela saturação de dois dos anéis de pirrolo e pela presença de dois grupos electropositivos carbonilo e um grupo acrilato conjugado com a porfirina.



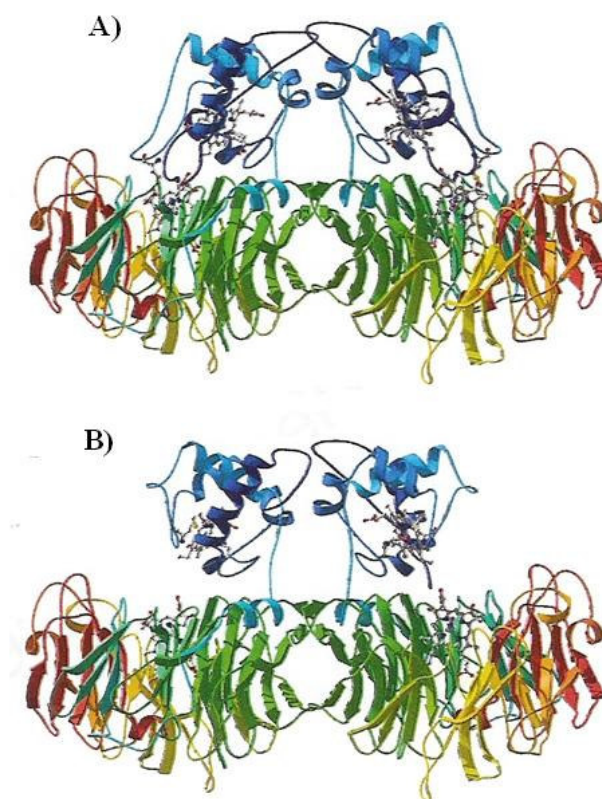
**Fig. I.13:** Estrutura do *hemo d<sub>1</sub>*.

Jafferji *et al.* (2000) propuseram a existência de três vantagens importantes que poderão explicar a razão pela qual se desenvolveu a biosíntese deste tipo de *hemo*, especializado na redução de nitrito a óxido nítrico. Em primeiro lugar, a estrutura do anel estabiliza o estado ferroso, permitindo a ligação do nitrito. Em segundo lugar, este tipo de estrutura pode favorecer a libertação do NO, atendendo ao enfraquecimento da ligação causado pela presença de grupos captadores de electrões na periferia do anel.

Por último, o potencial de redução do *hemo d*<sub>1</sub>, particularmente se for considerado o seu ambiente na estrutura da proteína, é tal que a redução do NO a hidroxilamina se encontra bloqueada por motivos termodinâmicos. Contudo, tal não acontece com a redução de NH<sub>2</sub>OH a amónia (Jafferji *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2005).

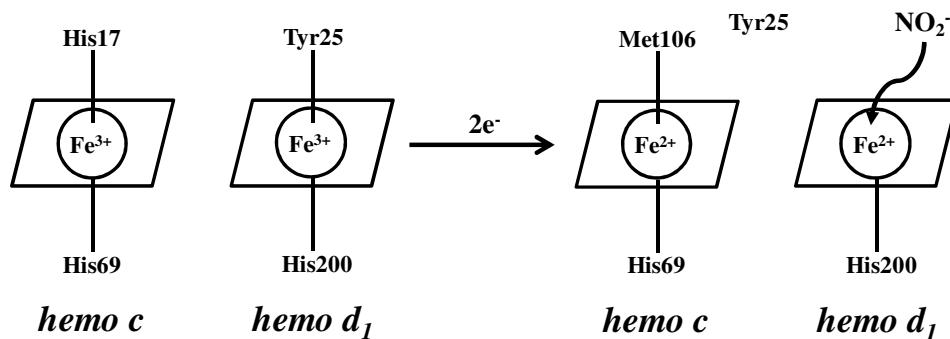
#### I.2.4.3 – A *cd*<sub>1</sub>NiR de *Paracoccus pantotrophus*

A proteína do organismo *Paracoccus pantotrophus* (Pp) possui a sua estrutura tridimensional resolvida, tanto na forma nativa (Baker *et al.*, 1997) como no estado reduzido (Jögren & Hajdu, 2001). Esta enzima sofre modificações estruturais significativas ao ser reduzida, incluindo uma curiosa “troca” de ligandos axiais em ambos os *hemos* que culmina com a dissociação do resíduo de tirosina que ocupa a posição de ligação ao substrato na forma nativa (figura I.14) (Williams *et al.*, 1997).



**Fig.1.14:** Estrutura tridimensional da *cd*<sub>1</sub>NiR de *Paracoccus pantotrophus* ( Williams *et al.*, 1997). **A)** Forma nativa (oxidada); **B)** Forma reduzida.

De forma a salientar as alterações conformacionais sofridas pela enzima após redução, apresenta-se na figura I.15 a representação esquemática dos co-factores e resíduos de aminoácidos envolvidos no processo.



**Fig.I.15:** Representação esquemática das alterações sofridas a nível dos *hemos* na redução da *cd<sub>1</sub>NiR* de *Paracoccus pantotrophus*.

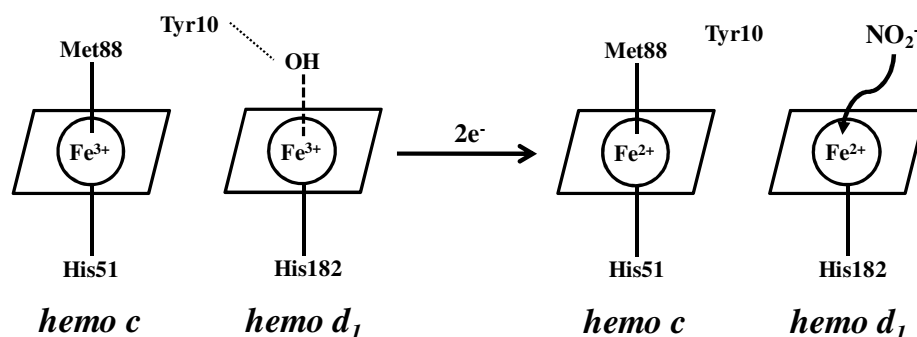
Devido à amplitude das modificações estruturais encontradas considerou-se, na altura, que a Tyr25 teria um papel preponderante, quer na estabilização desses co-factores, com a sua saída a promover o rearranjo na coordenação do *hemo c*, quer na catálise, possibilitando o acesso do substrato ao centro activo e impedindo a formação do intermediário *d<sub>1</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO*, um aducto extremamente estável que poderia conduzir à inactivação da enzima e vulgarmente conhecido por *dead-end product*. Porém, trabalhos subsequentes realizados com mutantes nos quais o resíduo Tyr25 não se encontrava presente vieram mostrar que a alteração na coordenação axial do *hemo c* para His/Met, mediante redução, ocorre independentemente da presença da Tyr25 na sexta posição de coordenação do *hemo d<sub>1</sub>* e que a enzima continua activa enquanto redutase do nitrito, mesmo na ausência deste resíduo nas imediações do centro activo (Gordon *et al.*, 2003). Porém, foi igualmente demonstrado que a troca de ligandos que ocorre no *hemo c* é fundamental para o correcto funcionamento do ciclo catalítico, com a criação de um mutante no qual a Met106 foi substituída por uma His a ser incapaz de libertar o NO formado (Zajicek *et al.*, 2006).

Inicialmente, foi também proposto que a proteína deveria estar totalmente reduzida para permitir a ligação ao substrato e que, só nesse caso ocorreria catálise (Richter *et al.*, 2002). Contudo, provou-se mais tarde que, a exposição da enzima oxidada ao substrato era suficiente para desencadear a troca de ligandos que faculta a catálise (van Wonderen *et al.*, 2007) e que a presença de nitrito nas imediações do centro activo é suficiente para remover o NO formado, com as características únicas do *hemo d<sub>1</sub>* a promoverem a dissociação do complexo *d<sub>1</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO* (Oganesyan *et al.*, 2007).

A resolução da estrutura tridimensional da *cd<sub>1</sub>NiR* de *Pa* quer na forma nativa (Nurizzo *et al.*, 1997) quer na forma reduzida (Nurizzo *et al.*, 1998), permitiu verificar a existência de diferenças consideráveis relativamente á enzima de *Pp*, sendo que as *cd<sub>1</sub>NiRs* destes dois organismos têm sido alvo de exaustivas comparações por parte de diversos autores (Cutruzzolà, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001; Wherland *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2008).

#### I.2.4.4 – A *cd<sub>1</sub>NiR* de *Pseudomonas aeruginosa*

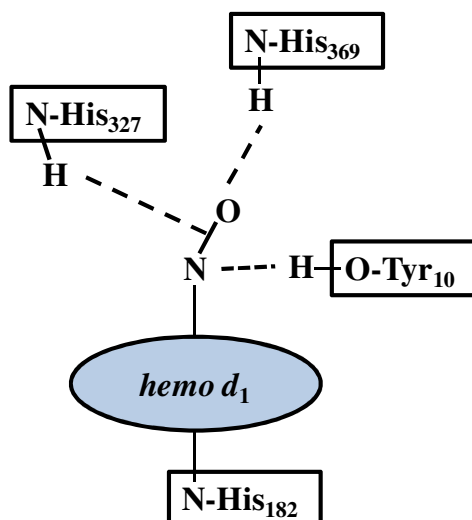
Estudos realizados com a *cd<sub>1</sub>NiR* de *Pa* revelaram que, nesta proteína, não ocorre a troca de ligandos no *hemo c*, e que a actividade catalítica pode acontecer sem a necessidade de um passo prévio de activação (redução) (Rinaldo *et al.*, 2007A, 2007B). Tal deve-se, sobretudo ao facto de o ligando axial distal do *hemo d<sub>1</sub>* ser um anião hidroxilo, facilmente substituível pelo nitrito (figura I.16), sugerindo que a ligação do substrato é, na realidade, o factor que despoleta a redução da enzima.



**Fig.I.16:** Representação esquemática da redução da *cd<sub>1</sub>NiR* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Contrariamente ao observado nos complexos Mb(FeII) – NO e Hb(FeII) – NO (Kharitonov *et al.*, 1997) a dissociação do produto da reacção (NO) do *hemo d<sub>1</sub>* reduzido ocorre de uma forma extremamente fácil ( $K_d \approx 10^7$  M) (Rinaldo *et al.*, 2007B). Para justificar tal facto, foi postulada a existência de uma importante contribuição para a destabilização do produto por parte das His327 e His369, presentes nas imediações do centro activo (Cutruzzolà *et al.*, 2001), para além das características singulares do *hemo d<sub>1</sub>* referidas na secção I.2.4.2.

Estudos adicionais, recentemente publicados, confirmam esse facto (Radoul *et al.*, 2011). De acordo com estes autores, as ligações por pontes de hidrogénio verificadas entre o produto e os resíduos de His adjacentes enfraquecem a ligação *d<sub>1</sub>-Fe<sup>2+</sup>-NO* (fig. I.17), de forma a permitir a sua saída, mediante a aproximação de um novo ião nitrito.

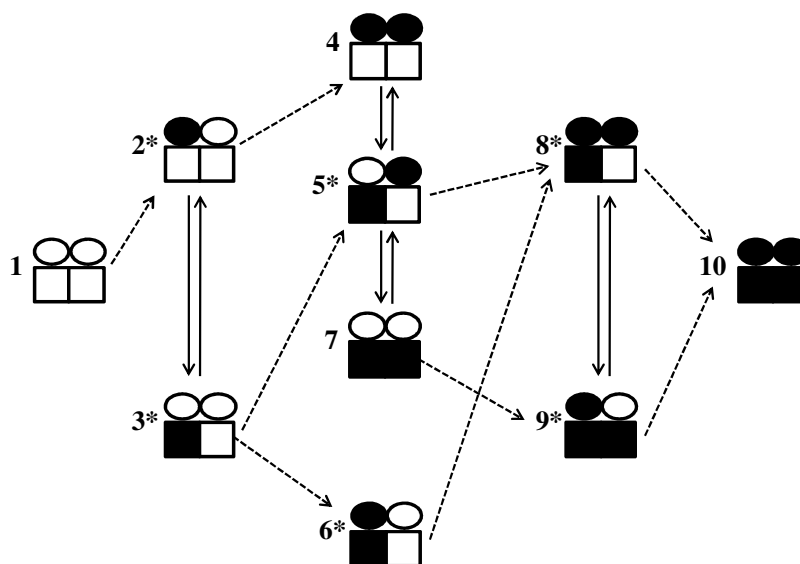


**Fig.I.17:** Representação esquemática do centro activo da  $cd_1NiR$  de *Pseudomonas aeruginosa*, com NO ligado (Radoul *et al.*, 2011).

#### I.2.4.5 – Processos de Transferência Electrónica

Os aspectos mais controversos do mecanismo catalítico das  $cd_1NiR$  estão relacionados com os processos de transferência electrónica inter (Lojou *et al.*, 2003) e intramolecular (Kobayashi *et al.*, 2001; Wherland *et al.*, 2005) que ocorrem no decurso da catálise, sendo genericamente aceite que a transferência electrónica intramolecular entre os hemo  $c$  e  $d_1$  é um aspecto preponderante do ciclo catalítico desta enzima, independentemente da sua origem (Kobayashi *et al.*, 2001; Wherland *et al.*, 2005).

Estudos cinéticos e termodinâmicos realizados com a  $cd_1NiR$  de *Pseudomonas stutzeri* (Ps) revelaram a existência de um forte controlo alostérico no processo de transferência electrónica intramolecular. A distribuição interna de equivalentes de redução entre os hemo  $c$  e  $d_1$  em cada monómero depende do número de equivalentes de redução recebidos pela enzima (Farver *et al.*, 2002, 2003), com experiências recentes realizadas com a enzima de Pa a produzirem resultados semelhantes (Farver *et al.*, 2009). No diagrama da figura I.18 encontra-se representado esquematicamente o mecanismo de redução proposto.



**Fig.I.18:** Mecanismo proposto para a redução sequencial da  $cd_1NiR$  de Pa (Farver *et al.*, 2009). Os símbolos a branco representam estados oxidados e a negro os estados reduzidos; *hemo c* (●), *hemo d<sub>1</sub>* (■). As setas a tracejado representam transferências eletrônicas intermoleculares irreversíveis e as setas a cheio transferências eletrônicas intramoleculares, reversíveis, na mesma subunidade. Os passos assinalados com \* representam dois estados equivalentes possíveis.

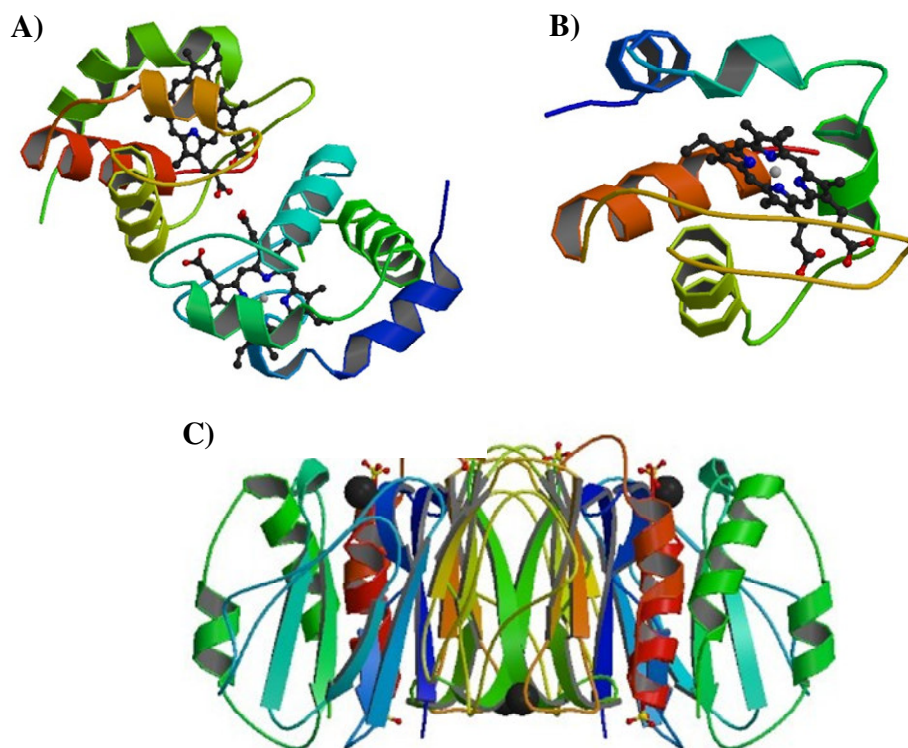
Em suma, a libertação do NO após redução do nitrito no centro activo da  $cd_1NiR$  é condicionado por uma série de factores estruturais e funcionais inerentes á proteína. A um controlo alostérico do processo de redução, com a distribuição sequencial dos electrões recebidos através dos quatro centros redox do dímero, alia-se o enfraquecimento da ligação  $Fe^{2+}$  - NO produzido, quer pela diminuição de densidade electrónica ao átomo de Fe, resultante da estrutura do próprio *hemo d<sub>1</sub>*, quer pela criação de pontes de hidrogénio com o NO, em consequência da presença dos resíduos de His nas imediações do centro activo.

#### I.2.4.6 – Parceiros Fisiológicos

A catálise de reacções de redução pressupõe a redução prévia da enzima envolvida no processo. Para esse efeito, é necessária a presença de um agente redutor, capaz de transferir electrões para a proteína. Os parceiros fisiológicos são, assim, os agentes redutores que, *in vivo*, fornecem á enzima os electrões necessários para completar o ciclo catalítico, tratando-se frequentemente de outras proteínas ou complexos proteicos.

Os parceiros fisiológicos das  $cd_1NiR$  são pequenos transportadores de electrões cuja função consiste em transferir electrões para o *hemo c*. Dependendo do organismo, pertencem à classe das cupradoxinas ou citocromos de tipo *c*.

O parceiro fisiológico da proteína de *Paracoccus pantotrophus* é a pseudoazurina (Zajicek *et al.*, 2006; Sam *et al.*, 2008), a enzima de *Pseudomonas aeruginosa* tem por parceiro o citocromo-*c*<sub>551</sub> (Lojou *et al.*, 2003) e a *cd*<sub>1</sub>NiR de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* recebe electrões provenientes do citocromo-*c*<sub>552</sub> (Lopes *et al.*, 2001). Na figura I.19 apresentam-se as estruturas tridimensionais destas três proteínas.



**Fig.I.19:** Estruturas tridimensionais dos parceiros fisiológicos de *cd*<sub>1</sub>NiRs provenientes de três organismos distintos. **A)** Citocromo-*c*<sub>552</sub> de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, dímero (Brown *et al.*, 1999; PDB-1CNO); **B)** Citocromo-*c*<sub>551</sub> de *Pseudomonas aeruginosa*, monómero (Matsuura *et al.*, 1982; PDB-351C); **C)** Pseudoazurina de *Paracoccus pantotrophus*, dímero (Najmudin *et al.*, 2010; PDB-3ERX).

No caso da *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, salienta-se que o citocromo-*c*<sub>552</sub> (cit-*c*<sub>552</sub>) não é parceiro exclusivo da *cd*<sub>1</sub>NiR. Na verdade, para além de apresentar a capacidade de transferir electrões para a *cd*<sub>1</sub>NiR de *Pseudomonas aeruginosa* (Lojou *et al.*, 2003), esta proteína foi também identificada como sendo o parceiro fisiológico da redutase do óxido nítrico (N<sub>2</sub>OR), a enzima responsável pela redução do N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, o ultimo passo da desnitrificação (Dell'aqua *et al.*, 2008).

### **1.2.5 – *Pseudomonas nautica*, *Marinobacter aquaeolei*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

Ao leitor da presente dissertação não será certamente, alheio o facto de a  $cd_1NiR$  alvo deste estudo ser identificada como proveniente da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Contudo, grande parte dos artigos citados sobre a mesma, bem como estruturas e sequências retirados de bases de dados oficiais, referem-se às bactérias *Pseudomonas nautica* e/ou *Marinobacter aquaeolei*. Tal acontece porque esta bactéria tem sido alvo de sucessivas revisões taxonómicas, as quais são, de forma resumida, expostas em seguida.

A bactéria desnitrificante marinha *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (*M. hydrocarb.*; Mh), um aeróbio facultativo, foi descrita pela primeira vez por Gauthier *et al.* em 1992, tratando-se da única espécie pertencente a um novo género: *Marinobacter*. Este género visava englobar bactérias marinhas, pertencentes à subclasse  $\gamma$  das Proteobactérias, as quais possuíam uma versatilidade metabólica que lhes conferia a capacidade de utilizar substratos considerados recalcitrantes, nomeadamente hidrocarbonetos, como fontes simultâneas de carbono e energia (Márquez & Ventosa, 2005).

Num estudo taxonómico que estabeleceu a relação filogenética entre 50 estirpes diferentes de bactérias (essencialmente marinhas), publicado por Kita-Tsukamoto *et al.* em 1993, referia o facto de a *Pseudomonas nautica* (espécie caracterizada por Baumann *et al.* em 1972) se encontrar claramente separada das espécies pertencentes ao género *Pseudomonas* terrestres.

Em 1998, Sproer *et al.* concluíram, através de uma abordagem taxonómica polifásica, que, na realidade, a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* era a *Pseudomonas nautica*, considerando a classificação como Mh mais correcta.

Já em 1999, Huu *et al.*, descreveram uma nova espécie de *Marinobacter*, que denominaram *Marinobacter aquaeolei*. Porém, em 2005, uma comparação exaustiva a nível fenotípico e filogenético, conduzida por Márquez e Ventosa, veio restabelecer a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* como a única espécie do género *Marinobacter*, considerando que *Marinobacter aquaeolei* deverá ser considerado como um sinónimo heterotípico, sem direito de procedência.

Refere-se ainda que, à data da conclusão desta dissertação, as bases de dados UniProt, PDB e KEEG já actualizaram os seus registos, apresentando a bactéria pela designação *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.



## I.3 – Materiais e Métodos

### I.3.1 – Materiais e Reagentes

#### I.3.1.1 – Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$

As soluções tampão utilizadas no decurso da purificação foram preparadas com água destilada proveniente de um sistema Automatic type II water ( $2,7\mu\text{Scm}^{-1}$ ) da Wasserlab. O tris(hidroximetil)aminometano (Tris base;  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ;  $121,14\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,9\%$ ) foi fornecido pela Sigma, o ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ;  $36,46\text{ g mol}^{-1}$ ;  $37\%$ ) é proveniente da Riedel-de-Haën e o ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ;  $174,11\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 87\%$ ) foi adquirido à Merck. As resinas de permuta aniónica DE-52 e Source-15Q foram adquiridas, respectivamente, à Whatman e à Amersham Biosciences. A coluna XK-26/40 é proveniente da Pharmacia. As membranas de diálise ( $\varnothing = 25,4\text{mm}$ ; capacidade de  $5\text{ mlcm}^{-1}$ ; cut-off 12 a 14 kDa) são provenientes da Viskin, as membranas YM3 e YM30 foram obtidas à Millipore e os filtros de seringa com membranas de polietersulfona com  $0,45\mu\text{m}$  de tamanho de poro foram fornecidos pela VWR International.

Os reagentes utilizados na preparação dos géis para electroforese foram adquiridos à Bio-Rad e os marcadores de massa molecular fornecidos pela Fermentas e pela Bio-Rad.

As proteínas foram quantificadas com um kit da Pierce, usando albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), como padrão.

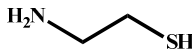
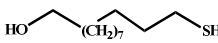
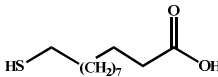
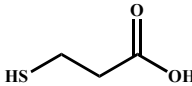
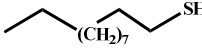
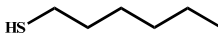
#### I.3.1.2 – Electroquímica

As soluções foram preparadas com água desionizada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ;  $18\text{ M}\Omega\text{cm}$ ) proveniente de um sistema de purificação de água MilliQ da Millipore. Os compostos utilizados para a modificação dos eléctrodos de ouro com camadas automontadas encontram-se descritos na tabela I.2. O cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ;  $74,56\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,5\%$ ), o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ;  $69,00\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ), o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $34,01\text{ g mol}^{-1}$ ;  $30\%$ ) e o etilenodiamina-tetraacetato de sódio (EDTA;  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $372,24\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ) são provenientes da Merck. O acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ;  $136,08\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,5\%$ ), o hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ;  $40,00\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ) e o etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ;  $46,07\text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,8\%$ ) foram adquiridos à Riedel-de-Haën.

Os sais de tampão ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES;  $C_8H_{18}N_2O_4S$ ; 238,31  $gmol^{-1}$ ;  $\geq 99,5\%$ ), ácido 3-(ciclo-hexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO;  $C_9H_{18}NO_4SNa$ ; 259,30  $gmol^{-1}$ ), 4-morfolineetanosulfonato de sódio (MES;  $C_6H_{12}NNaO_4S$ ; 217,22  $gmol^{-1}$ ), ácido N-[Tris(hidroxi metil)metil]-3-aminopropanosulfónico (TAPS;  $C_7H_{17}NO_6S$ ; 243,28  $gmol^{-1}$ ;  $\geq 99,5\%$ ) e o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ; 98,08  $gmol^{-1}$ ; 95-97%) foram adquiridos à Sigma. A pasta de alumina é originária da Buehler. O álcool polivinílico modificado com grupos azida pendentos (PVA-AWP) foi adquirido à Toyo Gosei, Japão.

As placas de vidro revestidas com ouro de 11x11mm, para a obtenção de imagens por AFM, foram fornecidas pela Arrandee.

**Tabela I.2:** Modificadores de superfície utilizados na preparação dos eléctrodos de ouro com monocamadas automontadas.

Nome	Abreviatura	Fórmula Química	MM ( $gmol^{-1}$ )	Estrutura	Marca
cisteamina	Cs	$HS(CH_2)_2NH_2$	77,15		Sigma
11-mercapto-1-undecanol	MUOH	$HS(CH_2)_{11}OH$	204,38		Aldrich
ácido 11-mercaptoundecanoico	MUA	$HS(CH_2)_{10}CO_2H$	218,36		Aldrich
ácido 3-mercaptopropiónico	MPA	$HS(CH_2)_2CO_2H$	106,14		Aldrich
1-undecanotiol	MUNE	$HS(CH_2)_{10}CH_3$	188,40		Aldrich
1-hexanotiol	HT	$HS(CH_2)_5CH_3$	118,24		Fluka

## I.3.2 – Equipamentos

### I.3.2.1 –Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$

O pH das soluções foi aferido num aparelho modelo micro pH 2002 da Crison, equipado com um eléctrodo medidor de pH modelo 5209 da mesma marca.

As cromatografias a alta pressão foram realizadas num sistema cromatográfico Äkta Basic da Amersham Pharmacia biotech, controlado pelo *software* Unicorn 5.11 da GE Healthcare.

A espectrofotometria de UV/Vis. foi efectuada em espectrofotómetros UV-160A e UV-1800, ambos da Shimadzu.

As electroforeses foram realizadas em sistemas de pH descontínuo, segundo o método de Laemmli, em tinas de electroforese Mini-PROTEAN® 3, da Bio-Rad (mini-gel: 8 x 7 x 0,75 cm).

### **I.3.2.2 – Electroquímica**

Os eléctrodos de trabalho de ouro policristalino foram fornecidos pela Methrom ( $\varnothing=3\text{mm}$ ) e pela BAS ( $\varnothing=2\text{mm}$ ). O eléctrodo de referência, eléctrodo saturado de calomelanos (SCE,  $-242\text{mV}$  *vs* NHE) e o contra-eléctrodo de platina (Pt) foram ambos adquiridos à Radiometer. Os eléctrodos de pasta de carbono “screen printed” (CPSPEs) foram preparados na CIDETEC (Ochoteco *et al.*, 2009). Os CPSPEs foram preparados segundo uma configuração de três eléctrodos nomeadamente, um eléctrodo de trabalho de pasta de grafite ( $\varnothing = 3,1\text{mm}$ ), um pseudo eléctrodo de referência Ag/AgCl ( $302\text{ mV}$  *vs* NHE) e um contra-eléctrodo de pasta de grafite.

As células electroquímicas simples (modelo 6.1415.210) e termostatzada (modelo 6.1418.110) foram adquiridas à Methrom.

As medições foram realizadas num potenciostato Autolab PSTAT 12 da Eco-Chimie, controlado através do *software* GPES 4.9. O cabo adaptador (DRP-CAC) específico para ligação de SPEs ao potenciostato, foi fornecido pela Dropsens.

### **I.3.2.3 – Espectroscopia de Ressonância Raman**

As medições de espectroscopia de Ressonância Raman (RR) foram efectuadas com um microscópio confocal acoplado a um espectrógrafo de fase única (Jobin Yvon U1000) equipado com uma grelha de 1200 l/mm e um detector CCD (*charge-coupled device*) retro-iluminado arrefecido com azoto líquido. Utilizou-se uma célula de quartzo giratória (Hellma) concebida propositadamente para esta finalidade e um laser iónico de kriptón (Coherent Innova 302).

As experiências de SERR – *Surface-Enhanced Resonance Raman* foram realizadas numa célula espectroelectroquímica de concepção própria, a qual permite a alteração do potencial de eléctrodo em simultâneo com a aquisição de espectros SERR.

Recorreu-se a eléctrodos anelares de prata que desempenham as funções de eléctrodos de trabalho, um eléctrodo de referência Ag/AgCl e um contra-eléctrodo de Pt, sendo o potencial controlado por um potenciostato (PAR 263-A). Os espectros de SERR foram adquiridos numa geometria de retrodispersão com recurso ao microscópio confocal de Raman, com uma objectiva de trabalho de longa distância (20 x, N.A. 0.35).

#### **I.3.2.4 – Microscopia de Força Atómica**

As imagens foram produzidas num microscópio multimodal Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Veeco), equipado com sondas de óxido de silício (Tap300, BudgetSensors).

### **I.3.3 – Procedimentos Experimentais**

#### **I.3.3.1 – Purificação dos citocromos $c_{552}$ e $cd_1$**

Os citocromos  $cd_1$  ( $cd_1NiR$ ) e  $c_{552}$  (cit- $c_{552}$ ) foram purificados da bactéria marinha desnitrificante *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* estirpe 617 (*M. hydrocarb.*) com base no método descrito na bibliografia (Besson *et al.*, 1995; Fauque *et al.*, 1992) e aos quais se procederam a algumas modificações.

A *M. hydrocarb.* foi crescida na Unité de Fermentation do LCB-CNRS, em Marselha, França. A fracção solúvel foi obtida a partir do extracto bruto de acordo com o descrito por Correia *et al.* (2008).

O extracto solúvel foi submetido a um protocolo de purificação composto por três passos cromatográficos e baseado no método descrito por Besson *et al.* (1995). Todas as etapas do processo foram realizadas em meio aeróbio e a 4°C. A fracção solúvel foi submetida a diálise durante cerca de 12 horas em 10mM tampão Tris-HCl pH 7,6 e aplicada numa coluna DE-52 equilibrada na mesma solução. As proteínas foram eluídas com um gradiente compreendido entre 10mM e 1M de Tris-HCl pH 7,6.

O cit- $c_{552}$  não ficou retido na coluna, tendo sido eluído no decurso dos processos de carga e lavagem. A fracção de cit- $c_{552}$  puro foi concentrada, aliquotada e armazenada a 64µM em 10mM Tris-HCl pH 7,6 a -20°C.

A fracção composta maioritariamente pela  $cd_1NiR$  foi eluída a uma força iónica de aproximadamente 600mM. A fracção foi dialisada durante cerca de 12h contra 10mM Tris-HCl pH 7,6, filtrada e carregada numa coluna Source-15Q. Procedeu-se à cromatografia sob pressão com um gradiente 0,01 - 1M de Tris-HCl pH 7,6; seguida a 280, 410 e 640nm.

A cerca de 450mM Tris-HCl eluíu a fracção contendo maioritariamente  $cd_1NiR$ . Após nova diálise, repetiu-se o segundo passo cromatográfico resultando na obtenção da fracção final de enzima, a uma força iónica correspondente a 400mM de eluente. A proteína purificada foi concentrada a 375 $\mu$ M (46 mg/ml), aliquotada e armazenada a -20°C em 50mM Tris-HCl pH 7,6. Os géis resultantes das electroforeses foram corados rotineiramente com Azul Brilhante de Coomassie R-250 (Amersham, 1999). Os géis destinados à análise da fracção contendo cit- $c_{552}$  foram sujeitos ao método de coloração de *hemos*, de acordo com o procedimento descrito por Goodhew *et al.* (1986). A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido biciconínico (BCA).

### **I.3.3.2 – Cristalização da $cd_1NiR$**

A prospecção das condições de cristalização da  $cd_1NiR$  de *M. hydrocarb.* por difusão de vapor, foi realizada com recurso a um amplo leque de soluções precipitantes (*screens*) disponíveis comercialmente. A exposição da proteína aos agentes precipitantes foi efectuada pela técnica de *sitting drop*. Para a proteína nativa foram realizados ensaios em ambiente aeróbio numa gama de concentrações compreendida entre 10 e 45 mg ml<sup>-1</sup> ( $\approx$  80 a 375  $\mu$ M), a 4°C e a 20°C. Em condições anaeróbias procurou-se cristalizar a proteína reduzida com ditionito, a 23mg ml<sup>-1</sup> (187,5  $\mu$ M) e á temperatura ambiente ( $\approx$  25°C).

Procurou-se aperfeiçoar os cristais obtidos, quer através de ensaios com ligeiras alterações na composição da solução precipitante, nas mesmas condições experimentais; quer com recurso à técnica de *seeding*.

### **I.3.3.3 – Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Actividade da $cd_1NiR$ , co-imobilizada com o seu Parceiro Fisiológico em CPSPEs.**

O biossensor foi construído após a activação prévia da superfície do eléctrodo de trabalho impresso nos CPSPEs por aplicação de um potencial de 1V durante 120s, em 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os eléctrodos foram então lavados com dH<sub>2</sub>O e secos sob uma corrente de ar comprimido. Procedeu-se então à modificação das superfícies dos eléctrodos de trabalho de acordo com as condições óptimas, previamente definidas (Jorge, 2011) e que consistiram na aplicação de uma mistura de 100  $\mu$ M  $cd_1NiR$ /100  $\mu$ M cit- $c_{552}$  e 50% PVA na superfície do eléctrodo de trabalho, seguida de foto polimerização a 4°C, sob o feixe de uma lâmpada de halogénio de 20 W, durante 48 horas.

A célula electroquímica contendo 0,15 M KCl em 0,05 M tampão MES pH 6,3 como electrólito de suporte foi rigorosamente desarejada com árgon, antes e durante os ensaios. A generalidade dos voltamogramas cíclicos foi traçada numa janela de potencial compreendida entre 0,602 V e 0,020 V (*vs* NHE), a 50 mVs<sup>-1</sup>. A avaliação da resposta do biossensor á presença de nitrito foi realizada através de adições sucessivas de soluções de NaNO<sub>2</sub> na célula electroquímica.

#### **I.3.3.4 – Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Resposta Directa da *cd*<sub>1</sub>NiR num Sistema Electroquímico.**

##### **I.3.3.4.1 – Limpeza do Eléctrodo de Trabalho**

O eléctrodo de trabalho foi inicialmente sujeito a um cuidadoso processo de limpeza que consistiu em três fases. Em primeiro lugar a superfície foi submetida a uma limpeza mecânica, tendo sido polido com pasta de alumina de granulometrias sucessivamente inferiores (1µm, 0,3 µm e 0,05 µm), sendo abundantemente lavado com dH<sub>2</sub>O entre cada uma das pastas. Seguidamente, foi sujeito a um método de limpeza químico, o qual consiste na imersão durante 30 segundos numa mistura recém preparada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na proporção 3:1 (solução piranha). Finalmente procedeu-se a uma limpeza electroquímica da superfície através da realização de ciclos voltamétricos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M, entre 1,4 V e -0,4 V a 100 mVs<sup>-1</sup>. Regularmente, a eficácia do processo de limpeza era verificada por voltamentria cíclica, realizando ciclos voltamétricos em 0,5 M NaOH, entre 0,7 V e -1,4 V, a 20 mVs<sup>-1</sup>.

##### **I.3.3.4.2 – Selecção do Modificador de Superfície**

Imediatamente após a conclusão do processo de limpeza, o eléctrodo foi lavado com dH<sub>2</sub>O e etanol e, imediatamente mergulhado numa solução alcoólica 5 mM de cada um dos modificadores de superfície, onde permaneceu durante 12 horas à temperatura ambiente, de forma a garantir a formação de SAMs dos tióis na superfície de Au. O eléctrodo de trabalho foi depois removido da solução alcoólica, lavado com etanol e seco sob uma corrente de ar comprimido. Uma vez preparada a superfície do eléctrodo de trabalho, este foi imerso numa solução de *cd*<sub>1</sub>NiR 150µM (em 50 mM MES, pH 6,3) durante 2 horas a 4°C. O eléctrodo modificado foi então mergulhado numa solução de electrólito de suporte imediatamente antes de ser colocado na célula electroquímica.

Os ensaios de voltametria cíclica com vista a seleccionar o modificador de superfície que permitiria obter uma resposta directa da  $cd_1NiR$  foram realizados numa janela de potencial entre 0,4 V e -0,6 V vs SCE, a uma velocidade de varrimento de  $20\text{ mVs}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados numa célula electroquímica com uma configuração clássica de três eléctrodos, utilizando como electrólito de suporte tampão 0,05 M MES pH 6,3, sendo que se procedeu antecipadamente ao desarejamento da solução com um fluxo de argón.

Uma vez seleccionada a modificação de superfície adequada à obtenção de uma resposta da  $cd_1NiR$ , foram realizados ensaios de variação das condições de pH e de velocidade de varrimento.

#### I.3.3.4.3 – Caracterização do Eléctrodo Modificado

Imediatamente após o processo de limpeza acima descrito o eléctrodo de Au foi mergulhado numa solução de MUA onde permaneceu durante uma hora à temperatura ambiente. Passado esse período o eléctrodo de trabalho foi lavado com etanol e seco sob uma corrente de ar comprimido. Em seguida foi colocada a  $cd_1NiR$  ( $375\text{ }\mu\text{M}$  em 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) sobre a superfície de Au e permitiu-se que esta secasse ao ar. Imediatamente antes de se realizarem os ensaios, o eléctrodo foi mergulhado em solução de electrólito de suporte, de forma a remover o excesso de proteína.

A caracterização do eléctrodo modificado foi realizada por voltametria cíclica. Os ensaios foram realizados numa célula electroquímica equivalente e com os mesmos eléctrodos utilizado para a selecção do tiol.

De forma a evitar a variabilidade consequente do emprego de diferentes sais nas soluções tampão que constituiriam o electrólito de suporte para os ensaios a diferentes valores de pH, foi preparado um único electrólito constituído por HEPES, CAPSO, MES, TAPS, e acetato de sódio (20 mM cada) e 100 mM cloreto de potássio. Esta mistura constitui uma solução tampão que, por acerto com NaOH ou HCl, foi utilizada para a realização de ensaios a valores de pH compreendidos entre 5 e 9. Para cada um dos valores de pH testados, foram traçados voltamogramas cíclicos a velocidades de varrimento compreendidas entre 5 e  $1000\text{ mVs}^{-1}$ .

#### I.3.3.4.4 – Ensaio de Actividade para o Oxigénio Molecular

Os eléctrodos de trabalho foram preparados da forma descrita na secção anterior, sendo que, para o ensaio de controlo, não foi colocada proteína na superfície modificada. Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados numa janela de potencial entre 0,4 V e -0,4 V *vs* SCE, a uma velocidade de varrimento de 20 mVs<sup>-1</sup>, tendo sido realizados 10 varrimentos para cada ensaio. Os ensaios foram realizados numa célula electroquímica com uma configuração clássica de três eléctrodos, recorrendo a uma solução tampão 0,05 mM MES pH 6,3, não desarejada, como electrólito de suporte.

#### I.3.3.4.5 – Ensaio com Eléctrodos Modificados com SAMs Mistas.

Para cada uma das diferentes preparações, o eléctrodo de Au foi mergulhado numa solução contendo diferentes proporções de MUA e MUNE ou MUA e MUOH, de acordo com os dados da tabela I.3, onde permaneceu durante 1 hora á temperatura ambiente. Passado esse período o eléctrodo foi lavado com etanol e seco sob uma corrente de ar comprimido. Em seguida foi colocada a *cd*<sub>1</sub>NiR (375 µM em 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) sobre a superfície de Au e permitiu-se que esta secasse ao ar. Imediatamente antes de se realizarem os ensaios, o eléctrodo foi mergulhado em solução de electrólito de suporte, de forma a remover o excesso de proteína.

A caracterização do eléctrodo modificado foi realizada por voltametria cíclica, numa janela de potencial entre 0,5 V e -0,5 V *vs* SCE, a uma velocidade de varrimento de 20 mVs<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados numa célula electroquímica com uma configuração clássica de três eléctrodos, recorrendo a solução tampão 0,05 mM MES pH 6,3, como electrólito de suporte.

A actividade catalítica da *cd*<sub>1</sub>NiR para nitrito, quando adsorvido nas SAMs mistas, foi testada por adição ao electrólito de suporte de 1 mM de NaNO<sub>2</sub> antes de se proceder ao início da aquisição de dados.



**Tabela I.3:** Composição das soluções de tióis mistas utilizadas na modificação da superfície dos eléctrodos de ouro com monocamadas automontadas.

Solução	[MUA] / mM	[MUNE] / mM	[MUOH] / mM
1	100	0	0
2	80	20	0
3	60	40	0
4	40	60	0
5	20	80	0
6	0	100	0
7	100	0	0
8	80	0	20
9	60	0	40
10	40	0	60
11	20	0	80
12	0	0	100

### I.3.3.5 – Espectroscopia de Ressonância Ramman

As amostras de proteína nativa (150  $\mu$ M em 50 mM tampão Tris-HCl pH 7,6) foram inseridas na célula de quartzo giratória e submetidas a excitação com as linhas de 413 nm ou 647 nm. Os espectros RR da enzima foram medidos com uma potência de laser compreendida entre 2 a 8 mW e tempos de acumulação de 60 segundos. As medições com a proteína reduzida foram realizadas após a adição de ascorbato à solução. Todos os espectros apresentados correspondem à média de 8 aquisições.

### I.3.3.6 – Ressonância Ramman Amplificada por Superfície

Os eléctrodos anelares de prata, cujas superfícies foram polidas e contundidas de acordo com protocolos publicados, foram revestidos com SAMs de MUA ou Cs, por incubação, durante 12 horas em soluções alcoólicas 1 mM dos tióis. Procedeu-se igualmente ao revestimento de eléctrodos de Ag com surfactantes, a partir dos detergentes dissolvidos numa solução tampão, por adsorção espontânea.

Os discos de Ag revestidos foram posicionados na célula espectroelectroquímica conjuntamente com um eléctrodo de referência Ag/AgCl e um contra-eléctrodo de Pt. Foi adicionada solução proteica a 150  $\mu$ M à solução tampão de suporte presentes na célula espectroelectroquímica.

A adsorção espontânea da proteína a partir do tampão foi testada procedendo-se, de forma sistemática, à variação das condições de imobilização, nomeadamente: tempo de adsorção, potencial do eléctrodo de trabalho, tipo e proporção do tampão de suporte de SERR e adição de aditivos (DDAB, ácido cólico e MES).

Foi igualmente testado um método de imobilização alternativo, o qual consistiu na deposição do extracto de enzima directamente sobre o eléctrodo de trabalho, seguida de remoção do excesso de proteína na superfície por imersão em solução tampão. Foram empregues diversas abordagens a este método sendo que, consoante o caso, utilizou-se entre 10 e 20  $\mu\text{l}$  de extracto de  $cd_1\text{NiR}$ . Para além da deposição directa na superfície do eléctrodo de trabalho, apenas polida e/ou também contundida, procedeu-se a modificações prévias da superfície, designadamente o revestimento com diversas camadas de surfactante e com SAMs.

Todas as medições foram realizadas com excitação a 413 nm, uma potência de laser de 4mW e tempos de acumulação compreendidos entre 20 e 60 segundos.

As titulações espectroelectroquímicas de SERR foram realizadas num intervalo de potencial de -600 a 140 mV vs Ag/AgCl, com etapas de 20 a 50 mV. Para cada valor de potencial foi concedido ao sistema um tempo de equilíbrio de 5 minutos, o qual se confirmou ser suficiente. Os espectros da proteína imobilizada, adquiridos a cada potencial de eléctrodo, foram subsequentemente submetidos a uma análise de componentes.

#### **I.3.3.7 – Microscopia de Força Atómica**

As placas de vidro revestidas com ouro monocristalino foram imersas em solução piranha preparada no momento e, após lavagem com  $\text{dH}_2\text{O}$ , sujeitas a um tratamento térmico conhecido por *flame annealing* que consiste em submeter o ouro à parte mais quente de uma chama durante alguns segundos, esperar que arrefeça e repetir o processo mais duas ou três vezes. Este procedimento é indispensável à obtenção de uma superfície onde predomina a fase 111. A constituição da SAM de MUA e subsequente adsorção da  $cd_1\text{NiR}$  foram realizadas da mesma forma já descrita para os eléctrodos de trabalho. Foram ainda preparados controlos, um com a proteína adsorvida numa placa de mica (Controlo 1) e outro com uma placa de ouro modificada apenas com MUA (Controlo 2).

As imagens foram produzidas em modo *tapping* com uma frequência de oscilação de 300 kHz. As medições foram realizadas ao ar e à temperatura ambiente.

### I.3.4 – Aplicações Bioinformáticas

O alinhamento e respectivas comparações entre os conjuntos de sequências de resíduos de aminoácidos da *cd<sub>1</sub>NiR* foram realizados utilizando o programa ClustalW2.

A simulação da estrutura tridimensional da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* foi realizada recorrendo ao *Automatic Modelling Mode* do Swiss Model (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006) e ao *Mode Quick Phyre* do PHYRE (versão 0.2) – “*protein homology/analogy recognition engine*” (Kelley & Sternberg, 2009).

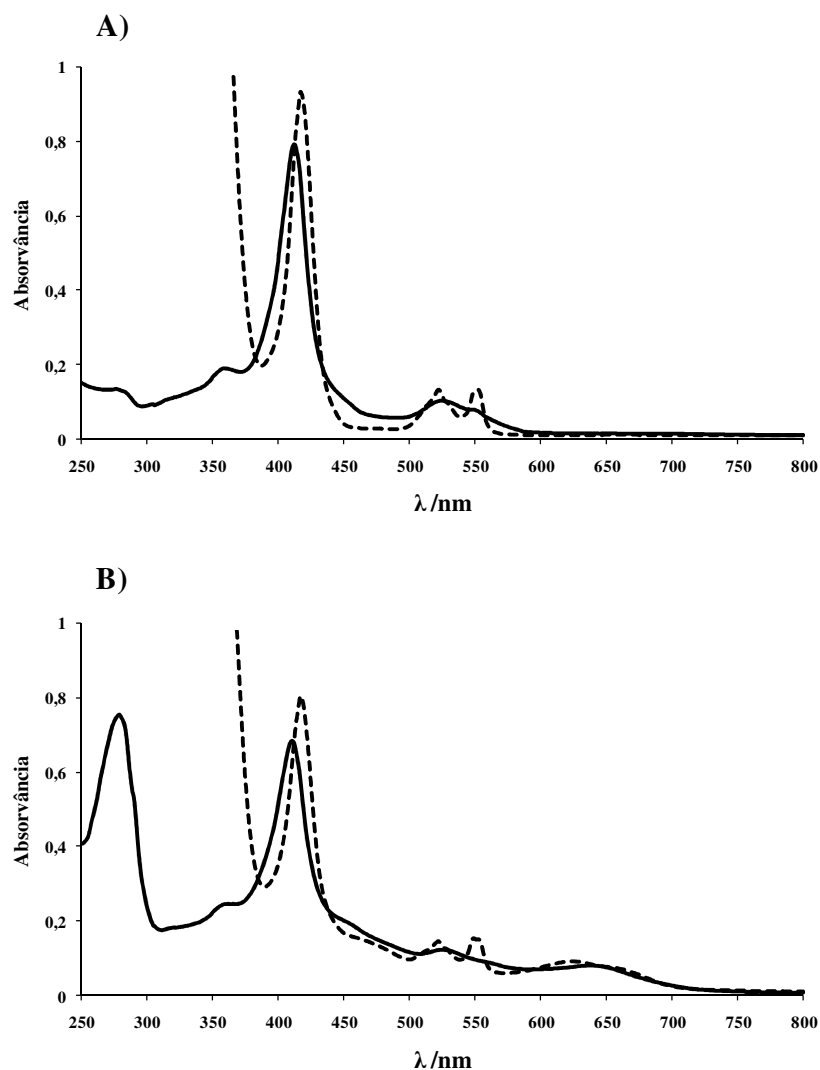
A simulação da forma dimérica da *cd<sub>1</sub>NiR* foi elaborada através do programa SymmDock (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005 (A,B)), que realiza previsões das estruturas de complexos com simetria C<sub>n</sub> (neste caso aplicou-se a restrição n=2) através de acoplamentos baseados em parâmetros geométricos.

As imagens da distribuição do potencial coulombiano na superfície da proteína foram obtidas com recurso à ferramenta *Coulombic Surface Coloring* existente no *software* UCSF Chimera (versão 1.4), assumindo 4,0 como valor da constante dielétrica. A coloração da superfície através de um mapa de potencial electrostático foi realizada com o programa CCP4MG (versão 1.114.2).

## I.4 – Resultados e Discussão

### I.4.1 – Purificação dos citocromos $c_{552}$ (cit- $c_{552}$ ) e $cd_1$ ( $cd_1$ NiR) da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* estirpe 617

As fracções finais de cit- $c_{552}$  e  $cd_1$ NiR foram analisadas por espectrofotometria de UV/Vis e electroforese em gel de poliacrilamida, encontrando-se os resultados obtidos nas figuras I.20 e I.21, respectivamente.



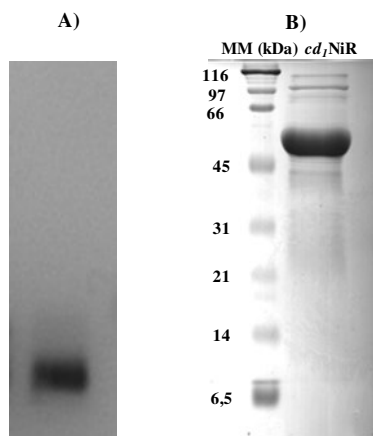
**Fig. I.20:** Espectros de absorção UV/Vis dos citocromos purificados de *M. hydrocarb.* antes (linha contínua) e após redução com ditionito (linha tracejada). **A)** cit- $c_{552}$ ; **B)**  $cd_1$ NiR

Na tabela I.4 encontram-se sumarizados os valores de comprimento de onda ( $\lambda$ ) aos quais se verificaram máximos de absorvância nos espectros apresentados na figura I.20.

**Tabela I.4:** Máximos de absorvância dos espectros UV/Vis dos citocromos  $c_{552}$  e  $cd_1$ , purificados de *M. hydrocarb.*.

Proteína	$\lambda$ / nm	
	cit- $c_{552}$	$cd_1$ NiR
<b>Estado Nativo (oxidado)</b>	276; 359; 412; 525	280; 360; 410; 520; 640
<b>Estado Reduzido</b>	417; 522; 552	416; 522; 552; 628

Os resultados apresentados são concordantes com os espectros publicados por Saraiva *et al.* (1994), para o cit- $c_{552}$  e por Fauque *et al.* (1992) para ambas as proteínas. As razões de pureza foram medidas a partir dos espectros das proteínas nativas, sendo 6,0 para o cit- $c_{552}$  ( $A_{412nm}/A_{280nm}$ ) e 1,1 para a  $cd_1$ NiR ( $A_{280nm}/A_{410nm}$ ). Estes valores indicam que ambas as proteínas foram obtidas com elevados graus de pureza, conclusão confirmada pelas imagens apresentadas na figura I.21.

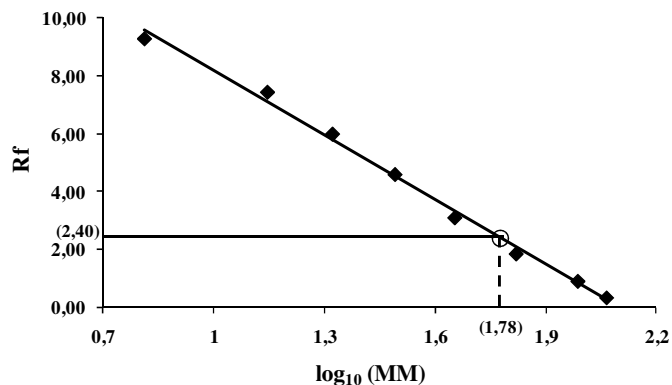


**Fig. I.21:** Fotografias de géis de poliacrilamida a 12,5% após electroforeses desnaturantes dos extractos proteicos. A) Linha de um gel correspondente à fracção final de cit- $c_{552}$ . O gel foi submetido a coloração de hemos, não havendo por isso, uma linha destinada a marcadores de massa molecular. B) Linhas de um gel contendo a fracção final de cit- $cd_1$ , corado com azul de Coomasie.

A necessidade de proceder à coloração de *hemos* para identificação do cit-  $c_{552}$  advém do facto de, para além de se tratar de uma proteína de dimensões reduzidas, apenas 10% dos resíduos de aminoácidos que a constituem possuírem cadeias laterais básicas (Argininas, Histidinas e Lisinas) (Saraiva *et al.*, 1994), facto que condiciona seriamente a eficiência da coloração com azul de Coomasie.

A identidade da *cd<sub>1</sub>NiR* foi ainda confirmada através do cálculo da massa molecular, realizado a partir dos dados da figura I.21B), por interpolação da curva de calibração apresentada na figura I.22.

Os resultados obtidos demonstram que a proteína purificada possui uma massa molecular de  $\approx 60$  kDa, correspondente à massa molecular da enzima na forma monomérica, tal como era esperado após a electroforese em condições desnaturantes.



**Fig. I.22:** Recta de calibração para a determinação da MM da *cd<sub>1</sub>NiR*. Os pontos representados correspondem ao Rf de cada proteína padrão, em função do logaritmo da sua massa molecular. A recta apresenta um declive de -7,455, ordenada na origem de 15,651 e coeficiente de correlação 0,995. A interpolação da recta encontra-se assinalada por um círculo, com os valores respectivos entre parênteses.

#### I.4.2 – Análise da Sequência de Resíduos de Aminoácidos

A sequência de resíduos de aminoácidos da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* (Copeland *et al.*, 2006) foi retirada da base de dados UniProtKB, onde se encontra registada com o código A1U5D0. As sequências de resíduos de aminoácidos da *cd<sub>1</sub>NiR* de *Pseudomonas aeruginosa* (Silvestrini *et al.*, 1989), *Pseudomonas stutzeri* (Yan *et al.*, 2006) e *Paracoccus pantotrophus* (Saunders *et al.*, 2000) foram retiradas da mesma base de dados, onde se encontram registadas com os códigos P24474, A4VQA9 e P72181, respectivamente. Na figura I.23 apresenta-se o resultado do alinhamento dos conjuntos de sequências das *cd<sub>1</sub>NiR*.

```

Mh  -MRVTKLMIKP-----LALAVAITSLGVMNAQAAPKDPDKSTMAEGTPS-----AVD 47
Pa  -MPFGKPLVG-----TLLASLTLLGLATAHA--KDDMKAAEQVQGAAS-----AVD 43
Pp  -MRQRTPFARPGLLASAAALVLGLPLAASAQEQVAPPKDPAAALEDKTRTDNRLEPSLD 59
Ps  MSNVGKPILAG-----VIAGLSLLGLAVAQA-----AAP 29

      . :      : :      *
Mh  AESAKIVRSPGAPD----LTDAEFKAKQIYFQRCAGCHGVLKRGATGKPLTPDITQ--- 100
Pa  P--AHVVRTNGAPD----MSESEFNEAKQIYFQRCAGCHGVLKRGATGKPLTPDITQ--- 94
Pp  NLAQQDVAAPGAPEGVSALSDAQYNEANKIYFERCAGCHGVLKRGATGKALTDPDLTR--- 116
Ps  E-----MTAEEKEAAKQIYFERCAGCHGVLKRGATGKNLEPHWTKTDA 72

      : :      : :      * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  -----ERGIDYLKAFISYGSAGMPNWLTSQDFDEETVELMAKYIMHEPPQPPPEF 150
Pa  -----QRGQQYLEALITYGTPLGMPNWGSSGELSKEQITLMAKYIQHTPPQPPPEW 144
Pp  -----DLGFDYLLQSFITYGSAGMPNWGTSGELSAEQVDLMANYLLLDPAAPPEF 166
Ps  DGKKTGGTTLNLGTRKLENITAYGTEGGMVNY--DDILTKEEINMMARYIQNTPDVPPPEF 130

      : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * : : : :
Mh  SLADMKETWEVIVPPEDRPKKOMNDLDLENLFSVTLRDAGQIALIDGDSKEVVKIIDTGY 210
Pa  GMPEMRESWKVLVKPEDRPKKQLNDLDLPNLFVSVTLRDAGQIALVDGDSKKIVKVIDTGY 204
Pp  GMKEMRESWKVHVAPEDRPTQENDWDLENLFSVTLRDAGQIALIDGATYEIKSVLDTGY 226
Ps  SLQDMKDSWKLIVPVDQRPKKOMNKINLKNVFAITLRDAGKLALVDGDTHTIWKVLDTGY 190

      : : : : : : : * : : : : * : : * : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  AVISRMSASGRYVLVIGRDALINMIDLWMEFPQTVAIKVGMARSVETSKYKGWEDKL 270
Pa  AVISRMSASGRYLLVIGRDARIDMIDLWAKEPTKVAEIKIGIEARSVESKFKGYEDRY 264
Pp  AVISRMSASGRYLFVIGRDGKVNMDLWMKEPTTVAEIKIGSEARSIEATSKMEGWEDKY 286
Ps  AVISRMSASGRYVYTVGRDGLTTIIDMWYEEPTTVAIVRLGSDARSVDTSKFKGYEDKY 250

      * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  AIAGTYWPPQFVIMDGTLEPKKIVSTRGMTVSTQEHPEPRVAATVASHAHPEFIVNVK 330
Pa  TIAGAYWPPQFAIMDGETLEPKQIVSTRGMTVDQTQYHPEPRVAATIASHEHPEFIVNVK 324
Pp  AIAGAYWPPQYVIMDGETLEPKKIQSTRGMTYDEQEHPEPRVAATLASHYRPEFIVNVK 346
Ps  LIGGTWPPQYSIMDGETLEPKIVVSTRGQTVDG-EYHPEPRVASIVASHIKPEWVNVK 309

      * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  ETGKIMLVNYEDMENMNIISTDAEYLHDGGWDASMRYFLTAANNSNKIAVVDQAQRNLE 390
Pa  ETGKVLVNYKIDNLTVTISGAAPFLHDGGWDSSHRYFMTAANNSNKVAVIDSKDRRLS 384
Pp  ETGKILLVDYTDLDNLKTTEISAERFLHDGGLDGSHRYFITAANARNKLVIDTKEGKLV 406
Ps  ETGQIILVDYTDLKNLKTITTESAKFLHDGGWDYSKRYFMVAANASNKVAAVDTKTGKLA 369

      * : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  AIVDVG-KIPHPGRGANFVDEHGPVWATSHLGDQTIQMIQIGTDPEG-----HPDKAKV 444
Pa  ALVDVG-KTPHPGRGANFVHPKYGPVWSTSHLGDGSIISLIGTDPN-----HPQYAKV 438
Pp  AIEDTGGQTPHPGRGANFVHPTFGPVWATSHMGDDSVLIGTDPEG-----HPDNAAK 461
Ps  ALVDTA-KIPHPGRGANFVHPQFQPVWTTGHLGDDVVSLLISTASDDPKYAKYKEHNK 428

      * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  RTVDGQGGGSLFVKTHPKSKNLWDTALNPAEAVSQSVAVFDINN-----DAGYDVLP 499
Pa  AELQGGGGSFLFKTHPKSSHLYVDTTFNPDAVISQSVAVFDLKNL-----DAKYQVLP 493
Pp  DSFPALGGGSLFKTHPKSNQYLYVDATLNPAEISGSVAVFDIKAMTGDGSDPEFKTLPI 521
Ps  QELKMPGAGNLFVKTHPKSKNLWADAPMNEPEREVAESVYVYDLADL-----SKAPKRL 483

      . * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  AEWAELGE--GPKRVVQPEYNKAGDEVWFVSWNTQDKKSAIVVVDKTRKLLKVKIKGDY 557
Pa  AEWADLGE--GAKRVVQPEYNKRGDEVWFVSWNGKNDSSALVVVDKTLKLVKAVKDPRL 551
Pp  AEWAGITE--GQPRVVQGEFNKDGTEVWFVSWNGKDQESALVVVDKTLKLVKIKDERL 579
Ps  AKDSGLPE-SKAIIRLATHPEYNKAGDEVWFVSWNGKTDQSAIVVIYDKTLKLVKITDPA 543

      * : : : * . * : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Mh  VTPTGKFNTYNTQHDVY 574
Pa  ITPTGKFNVYNTQHDVY 568
Pp  VTPTGKFNVYNTMTDTY 596
Ps  VTPTGKFNVNTMHDVY 560

      : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

**Fig. I.23:** Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos para a *cd<sub>1</sub>NiR* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus pantotrophus* e *Pseudomonas stutzeri*. Os ligandos axiais dos *hemos* encontram-se assinalados a verde (claro para o *hemo c* e escuro para o *hemo d<sub>1</sub>*). As regiões a amarelo correspondem a péptidos de sinal e as zonas de identidade entre as quatro proteínas apresentam-se destacadas a rosa.

Com base nos alinhamentos da figura I.23 foram calculados os graus de identidade e similaridade partilhados entre a sequência de resíduos de aminoácidos das enzimas dos quatro organismos (tabela I.5).

**Tabela I.5:** Graus de identidade e similaridade encontrados entre a sequência de resíduos de aminoácidos da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* e as sequências da mesma proteína de outras bactérias.

<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>
<b>Identidade (%)</b>	69,7	49,5	59,9
<b>Similaridade (%)</b>	91,1	76,0	83,0

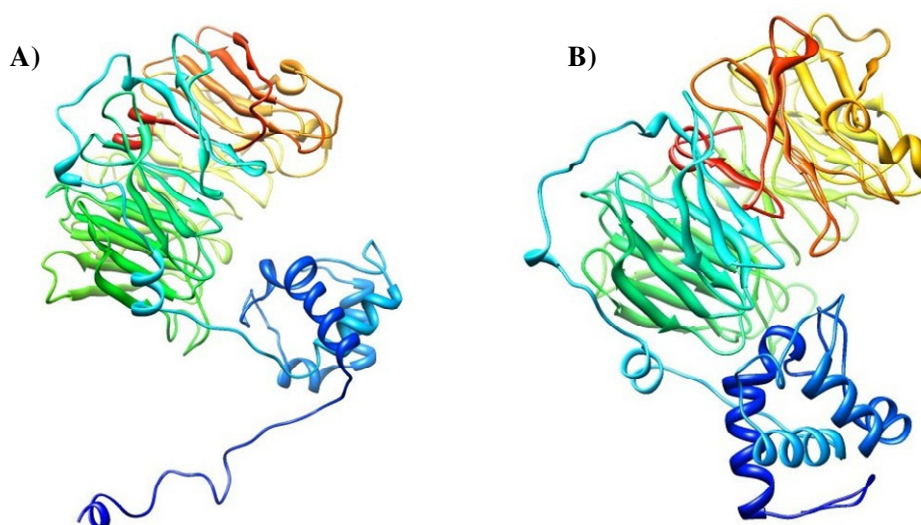
No cômputo geral, verifica-se que as diferenças nas sequências de resíduos de aminoácidos das enzimas dos quatro organismos são mais acentuadas na zona do *c*-terminal. Observa-se ainda que, para este conjunto, a proteína de *Ps. stutzeri* é a que mais difere das restantes. Tal como foi referido na secção I.2.4, existem diferenças substanciais nos motivos de ligação aos co-factores entre as proteínas de *Ps. aeruginosa* e *P. pantotrophus*, com importantes implicações ao nível do mecanismo de activação da enzima. O alinhamento das sequências veio demonstrar que a *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* apresenta um elevado grau de conservação relativamente à *cd<sub>1</sub>NiR* de *Ps. aeruginosa*, sobretudo no que respeita às áreas correspondentes aos motivos de ligação aos co-factores. Assim, é provável que a enzima de *M. hydrocarb.* realize a redução do nitrito através de um mecanismo semelhante ao proposto para a proteína de *Ps. aeruginosa*.

#### **I.4.3 – Previsão da Estrutura Tridimensional da *cd<sub>1</sub>NiR* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

A simulação da estrutura tridimensional da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* realizou-se recorrendo a dois programas distintos de modelação por homologia, de forma a comparar os resultados obtidos. Assim, foi utilizado o *Automatic Modelling Mode* do *Swiss Model* (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006) e o *Mode Quick Phyre* do *PHYRE* (versão 0.2) – “*protein homology/analogy recognition engine*” (Kelley & Sternberg, 2009). Embora distintas, ambas as estruturas eleitas pelos programas pertencem à enzima de *Pseudomonas aeruginosa*.

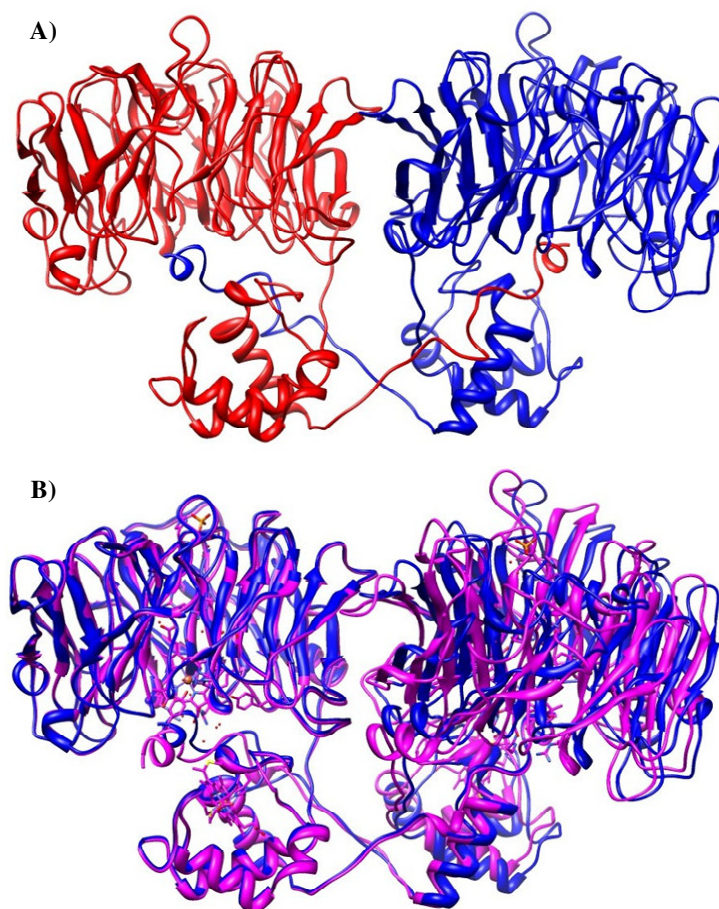


O modelo produzido pelo *Swiss Model* recorreu à estrutura depositada na PDB com o código **1HZU** (Brown *et al.*, 2001) e o modelo construído pelo PHYRE utilizou a **1N90** (Nurizzo *et al.*, 1999). Na figura I.24 apresentam-se imagens das estruturas construídas com recurso a ambos os programas.



**Fig. I.24:** Construção do modelo para a estrutura monomérica da *cd1NiR* de *M. hydrocarb.*: **A)** estrutura adquirida através do PHYRE, **B)** estrutura adquirida através do Swiss Model.

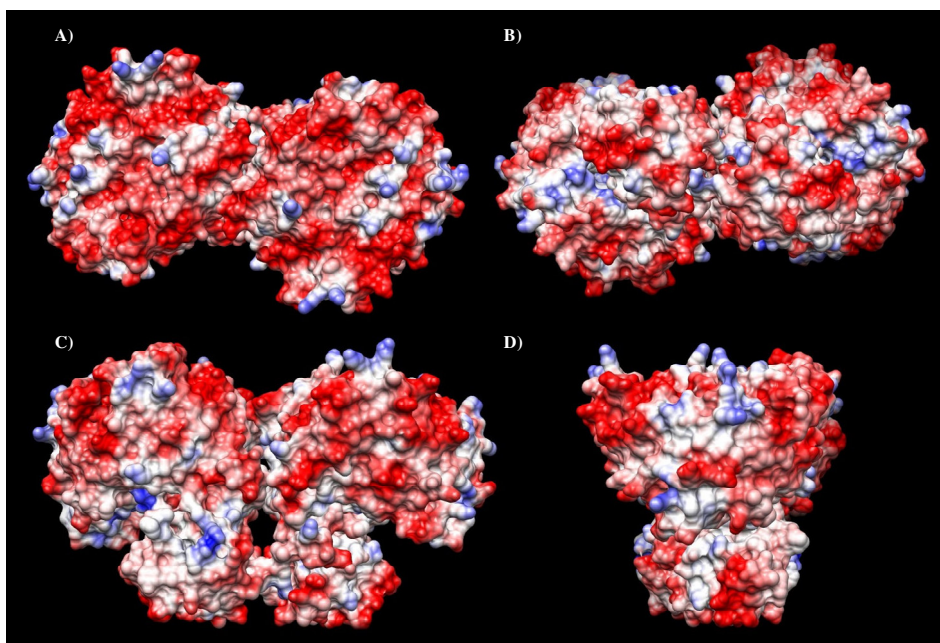
Para além de o *PHYRE* não ter realizado correctamente o *folding* na zona do *c*-terminal do monómero, considerou-se ainda o maior grau de identidade estrutural (73% vs 72%) e a maior resolução dos difratogramas de raios-X nos quais a estrutura se baseia (2,70Å vs 2,90Å), para seleccionar o modelo proveniente do *Swiss Model* para a subsequente modelação da estrutura dimérica da *cd1NiR* de *M. hydrocarb.*. Os resultados obtidos através da simulação da forma dimérica da proteína, elaborada através do programa *SymmDock* (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005 (A,B)), aplicando-se a restrição  $n=2$ , encontram-se representados na figura I.25.



**Fig. I.25:** Estruturas tridimensionais da  $cd_1NiR$ . **A)** Estrutura simulada para a proteína de *M. hydrocarb.*, **B)** Sobreposição da estrutura obtida por modelação (azul) com a estrutura da proteína de *Ps. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 1997; PDB-1NiR) (rosa).

Como se pode observar na imagem da figura I.25B, não é detectada qualquer diferença significativa entre as estruturas da  $cd_1NiR$  de *Ps. aeruginosa* e *M. hydrocarb.*, a nível do monómero. Ao considerar a forma dimérica da proteína verifica-se que a estrutura obtida por simulação pressupõe a existência de uma distância entre monómeros superior à verificada na enzima de *Ps. aeruginosa*. Esta diferença poderá dever-se ao facto de o algoritmo de previsão utilizado basear o acoplamento unicamente em parâmetros geométricos, não contemplando as interacções de natureza electrostática que certamente, contribuem para uma maior aproximação entre as duas unidades da proteína.

As imagens da distribuição do potencial coulombiano na superfície do modelo criado para a estrutura da enzima foram calculadas no software UCSF Chimera (figura I.26).

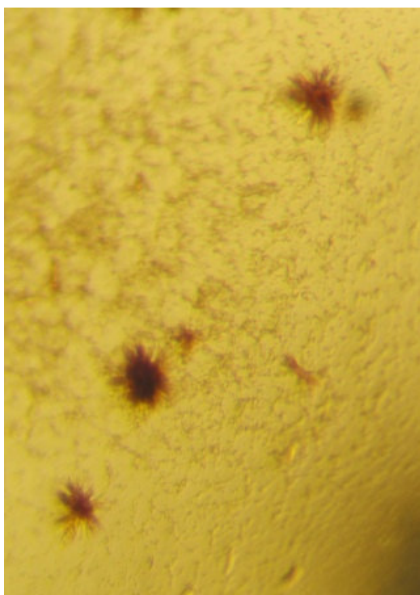


**Fig. I.26:** Distribuição do potencial coulombiano na superfície da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.*. **A)** Imagem de topo, **B)** Imagem de fundo, **C)** Imagem lateral 1, **D)** Imagem lateral 2. Os resíduos com carga negativa encontram-se representados a vermelho, os resíduos com carga positivo estão assinalados a azul e os resíduos com carga neutra são brancos.

Os resultados obtidos foram confirmados pela coloração da superfície através de um mapa de potencial electrostático calculado com o programa CCP4MG (imagens não apresentadas), comprovando-se que o mapa do potencial coulombiano é uma boa aproximação ao potencial electrostático da superfície da enzima, não existindo diferenças significativas entre os mapas produzidos por ambas as formas. Estes mapas serão utilizados nas secções seguintes para a discussão dos resultados obtidos.

#### I.4.4 – Cristalografia de Raios – X

Com o objectivo final de resolver a estrutura cristalográfica da *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* através da técnica de difracção de raios-X, foram realizadas experiências preliminares de cristalização para esta proteína. Assim, da ampla gama de condições de cristalização testadas, foi possível a obtenção de cristais em forma de ouriço, da *cd<sub>1</sub>NiR* na sua forma nativa, cuja fotografia se apresenta na figura I.27.



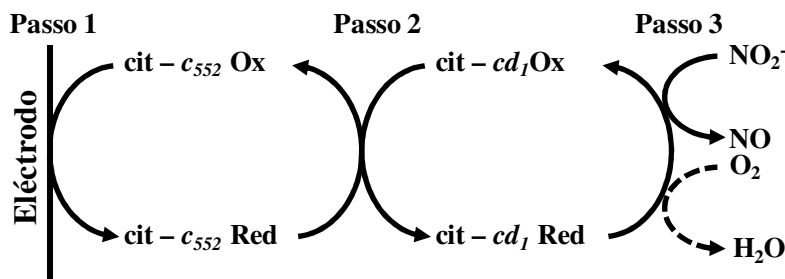
**Fig. I.27:** Fotografia de cristais de *cd<sub>1</sub>NiR* de *M. hydrocarb.* na forma nativa.

Os melhores cristais foram obtidos ao fim de 7 dias, a 20°C, com uma concentração total de proteína na gota de 11,5 mgml<sup>-1</sup> (93,75 µM), por exposição a uma solução precipitante composta por 20% PEG 4000, 100 mM tampão MES pH 6,5 e 600 mM NaCl. Contudo, não possuíam a qualidade necessária à realização de ensaios de difracção e, não obstante os esforços empregues no aperfeiçoamento dos cristais, tais tentativas foram, até ao momento, infrutíferas.

#### **I.4.5 – Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Co – Imobilização da *cd<sub>1</sub>NiR* com o seu Parceiro Fisiológico (cit-*c<sub>552</sub>*).**

De um modo geral, os mediadores redox empregues em biossensores são pequenas moléculas orgânicas electroactivas que não possuem afinidade específica para com o elemento de reconhecimento biológico. Usualmente, a sua aplicação tem por objectivos facilitar a transferência electrónica e/ou diminuir o potencial de trabalho (Chaubey & Malhotra, 2002). Porém, os mediadores artificiais são frequentemente nocivos/tóxicos e, tratando-se de catalisadores genéricos podem afectar a selectividade do sensor (Gorton *et al.*, 1999). Assim, foi explorada a possibilidade de utilizar, como alternativa aos mediadores artificiais, o parceiro fisiológico da enzima (cit-*c<sub>552</sub>*) como mediador electrónico de um biossensor enzimático para a quantificação de nitritos.

O dispositivo proposto consiste na co-imobilização da  $cd_1NiR$  com o  $cit-c_{552}$  numa matriz polimérica preparada a partir de um derivado do álcool polivinílico (PVA) fotopolimerizável e a sua subsequente aplicação em eléctrodos *screen-printed* de pasta de carbono (CPSPE) e, cujo esquema reaccional se encontra representado na figura I.28.

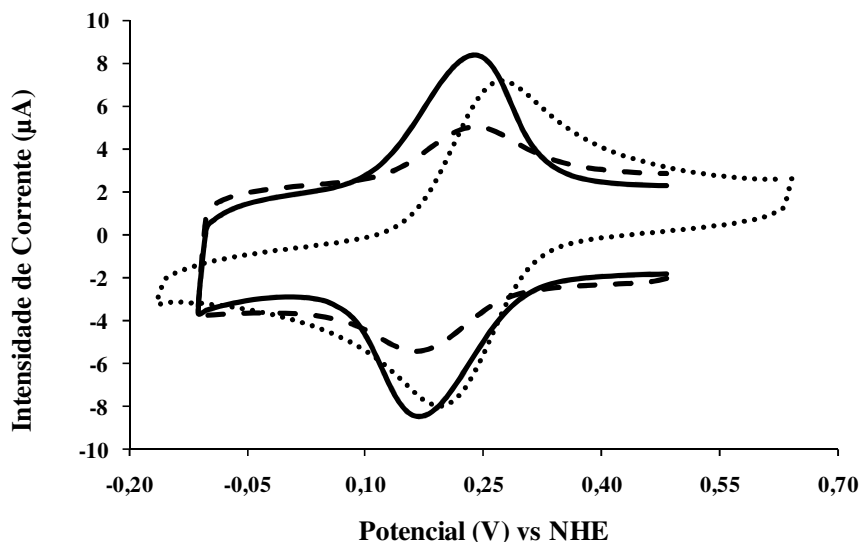


**Fig. I.28:** Esquema reaccional do bioelectrodo para a redução de nitrito a óxido nítrico (linha contínua) e de oxigénio molecular a água (linha descontinua), de acordo com um mecanismo EC.

A primeira fase do trabalho consistiu na optimização do sistema de imobilização, nomeadamente no que respeita á razão enzima/mediador, percentagem de PVA e tempo de polimerização, tendo este trabalho sido realizado em eléctrodos de trabalho de grafite pirolítica (PGE) (Jorge, 2011). Uma vez estabelecidos esses parâmetros, o sistema foi aplicado em CPSPEs procedendo-se, então, ao seu estudo.

#### I.4.5.1 – Caracterização Electroquímica do $cit-c_{552}$ Co – Imobilizado com a $cd_1NiR$ na Matriz Polimérica.

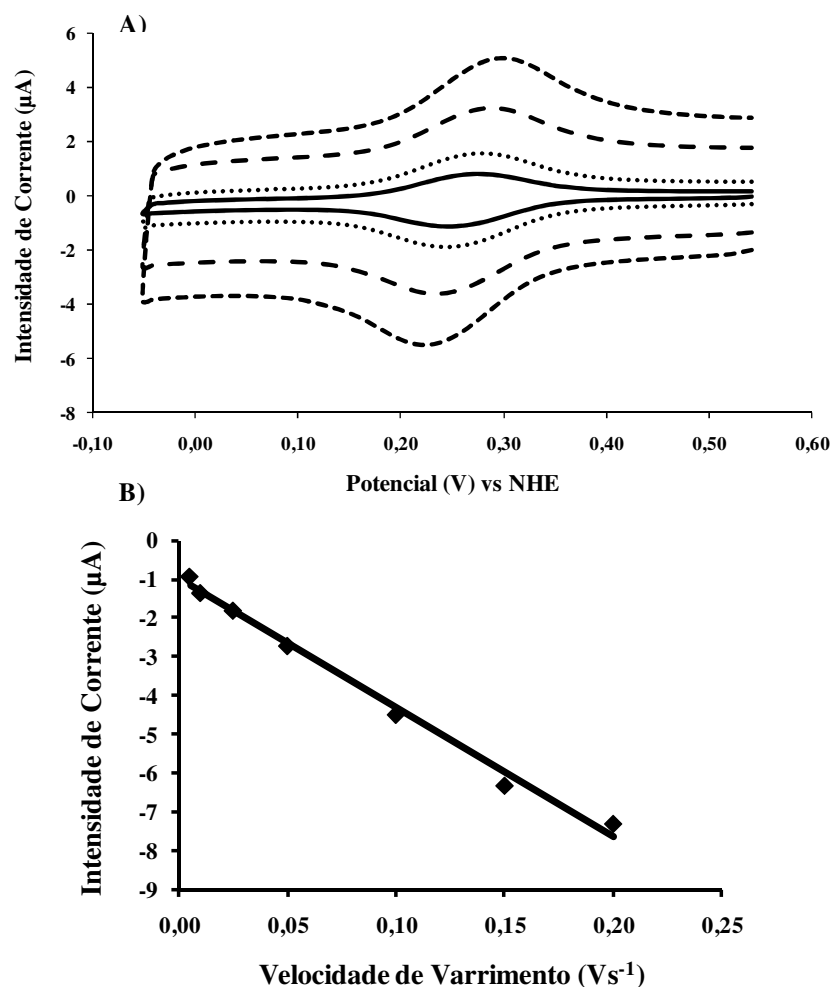
De forma a avaliar a possível influência da matriz de PVA no perfil voltamétrico do  $cit-c_{552}$ , procedeu-se à comparação dos sinais produzidos pelo mediador quando imobilizado na matriz de forma isolada, co-imobilizado na matriz conjuntamente com a  $cd_1NiR$  e co-aprisionado com a enzima num PGE através de uma membrana de diálise. Na figura I.29 encontra-se a sobreposição dos voltamogramas cíclicos obtidos.



**Fig. I.29:** Efeitos do encapsulamento. Voltamogramas cíclicos traçados em CPSPE com 100  $\mu\text{M}$  cit- $c_{552}$  encapsulado numa matriz constituída por PVA a 50% (48 horas de fotopolimerização) na ausência (linha a cheio) e na presença (linha a tracejado) de 100  $\mu\text{M}$   $cd_1\text{NiR}$ . A linha picotada representa um voltamograma cíclico traçado com 100  $\mu\text{M}$  cit- $c_{552}$  e 100  $\mu\text{M}$   $cd_1\text{NiR}$  co-aprisionados por uma membrana de diálise na superfície de um PGE. Todos os ensaios foram realizados em 50 mM MES pH 6,3 com 150 mM de KCl, a uma velocidade de varrimento de 50  $\text{mVs}^{-1}$ .

Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura I.29 demonstram que a co-imobilização das duas proteínas na matriz de PVA não altera o perfil voltamétrico do cit- $c_{552}$ , limitando-se a existir um decréscimo na intensidade de corrente gerada, em consequência da diminuição da área de contacto entre o mediador e a superfície do eléctrodo, provocado pela presença da enzima. Observou-se ainda que o encapsulamento das proteínas aumentou a simetria entre os picos de redução e oxidação da espécie electroactiva, aproximando este sistema do modelo de adsorção.

Na ausência de substrato, a análise dos voltamogramas cíclicos do cit- $c_{552}$ , traçados na presença de  $cd_1\text{NiR}$  a diferentes velocidades de varrimento (fig. I.30A) indicam que a transferência electrónica heterogenia entre o eléctrodo de trabalho e o mediador é uma reacção quasi-reversível, com valores de separação entre os picos próximos de zero e razões entre a intensidade dos picos de aproximadamente um.



**Fig. I.30:** Dependência relativamente à velocidade de varrimento da resposta electroquímica do cit-*C*<sub>552</sub> (100 μM), quando co-imobilizado com a *cd*<sub>1</sub>NiR (100 μM) numa matriz de 50% PVA (48h de polimerização) num CPSPE. Experiências realizadas em 150 mM KCl, 50 mM tampão MES, pH 6,3 como electrólito de suporte. **A)** Voltamogramas cíclicos; **B)** Relação linear entre a corrente do pico catódico e a velocidade de varrimento ( $r^2 = 0,992$ ).

O potencial formal  $E_0'$  foi estimado em  $254 \pm 2$  mV vs NHE, valor semelhante ao reportado para a mesma proteína em solução (Lopes *et al.*, 2001). A dependência linear entre a intensidade das correntes dos picos catódicos e as velocidades de varrimento (fig. I.30B) indica que a resposta é independente do transporte de massa.

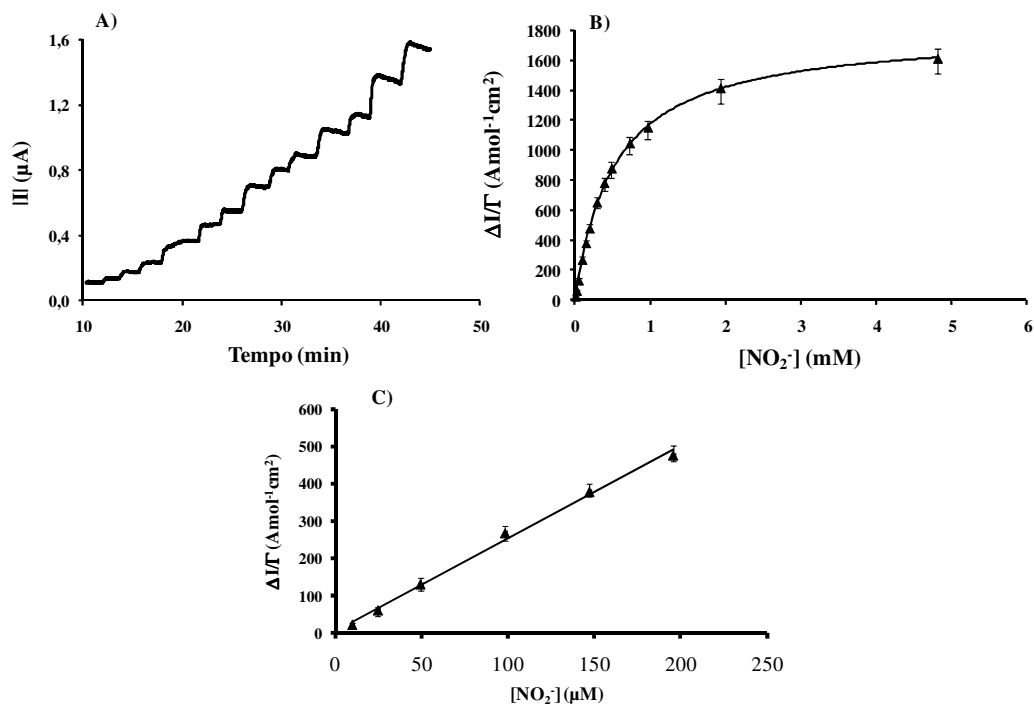
A análise da resposta do sensor em condições saturantes de substrato (2 mM) permitiu determinar a constante de velocidade de segunda ordem entre os citocromos  $c_{552}$  e  $cd_1$ . O valor obtido ( $9.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) é 1-2 ordens de grandeza inferior ao reportado para o mesmo par de proteínas em solução ( $4.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), demonstrando assim que a matriz de PVA influencia de forma significativa a eficiência do biossensor. Porém, a natureza da contribuição da matriz para a diminuição da constante de velocidade de transferência electrónica intermolacular não se encontra totalmente clarificada.

Uma vez que o processo de polimerização é passível de provocar alterações conformacionais nas proteínas, procurou-se realizar uma avaliação da integridade estrutural do hemo após o encapsulamento. Para tal, foram traçados os espectros UV/Vis de cada uma das proteínas, encapsuladas na matriz de PVA individual e conjuntamente. Porém, a própria matriz absorve radiação visível até 400 nm, impossibilitando uma correcta visualização da banda de absorção mais importante dos grupos hémicos, a banda de Soret (410 nm). Assim, os resultados obtidos foram inconclusivos. Porém, atendendo a que o potencial de redução do cit- $c_{552}$  quando aprisionado é muito semelhante ao registado para a proteína em solução e que a  $cd_1\text{NiR}$  permanece activo na forma imobilizada, inferiu-se que a existirem alterações conformacionais nas proteínas, induzidas pelo PVA, estas não afectarão de forma significativa os comportamentos electroquímico/catalítico de ambas. O decréscimo significativo verificado para a constante de velocidade de 2ª ordem poderá assim, resultar de uma diminuição na eficiência da transferência electrónica entre o mediador e a enzima, resultante da significativa redução da mobilidade que advém do aprisionamento.

#### **I.4.5.2 – Resposta a Nitrito**

As medições amperométricas para a calibração do bioeléctrodo foram realizadas a -0,1V vs o eléctrodo de referência incorporado, o que corresponde a 0,202 V vs NHE, um valor ligeiramente inferior ao potencial do pico catódico do mediador. A resposta amperométrica após adição de  $\text{NO}_2^-$  atingiu patamares de corrente em intervalos de tempo compreendidos entre os 50 e os 100 segundos, com linhas de base bastante estáveis e uma boa razão sinal/ruído (fig. I.31).





**Fig. I.31:** Resposta do biossensor a nitrito. **A)** Amperograma representativo registado a -0,1 V vs Ag/AgCl; **B)** Ajuste dos dados a uma equação de Michaelis-Menten, com recurso ao programa GraphPad Prism (v 4); **C)** Curva de calibração ( $y = 2.49x + 3.74$ ;  $r^2 = 0.996$ ). Os resultados apresentados representam o valor médio de três experiências independentes.

A resposta do biossensor ao substrato da  $cd_1NiR$  foi linear no intervalo 10 – 200  $\mu M$  (fig. 1.31C). O limite de detecção, calculado a partir da recta de calibração sob a forma de razão entre o triplo do valor do desvio padrão da ordenada na origem (sb) e a ordenada na origem (b), foi de 7  $\mu M$  ( $\approx 0,3$  ppm). O valor calculado para o limite de quantificação ( $10 \times sb/b$ ) foi de 24  $\mu M$  ( $\approx 1$  ppm). A sensibilidade, obtida através do declive da recta de calibração, é  $2,49 \pm 0,08 \text{ Amol}^{-1}\text{cm}^2\mu M^{-1}$  e, o  $K_M^{app}$  foi  $0,53 \pm 0,01 \text{ mM}$ .

Atendendo à revisão bibliográfica realizada para dispositivos semelhantes (tabela I.1), verifica-se que os únicos sistemas integrados que utilizam a  $cd_1NiR$  como elemento de reconhecimento biológico, o fazem com métodos de transdução ópticos (Ferreti *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2002). Esses sensores, embora apresentem limites de detecção abaixo de 7  $\mu M$ , requerem ensaios em amostras transparentes, facto que conduz à necessidade de tratamentos e/ou diluições elevadas das amostras em etapas prévias ao ensaio.

O elevado limite de detecção é, efectivamente, a principal desvantagem deste sensor. No caso dos biossensores que utilizam a *ccNiR* como elemento de reconhecimento biológico esta diferença já era esperada, atendendo à natureza da reacção de catálise protagonizada pela enzima multihémica (eq. 1.8), a qual envolve 6 electrões por cada molécula de substrato convertida. Porém, também os sensores integrados de *CuNiR* (Wu *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 2006) apresentam limites de detecção inferiores ao do sistema proposto. Uma vez que a sensibilidade calculada para este sensor contempla a influência do mediador electroquímico, algo inédito até ao momento, os valores obtidos são expressos em unidades não comparáveis com os que se encontram reportados na literatura, para sistemas que envolvem electroquímica mediada.

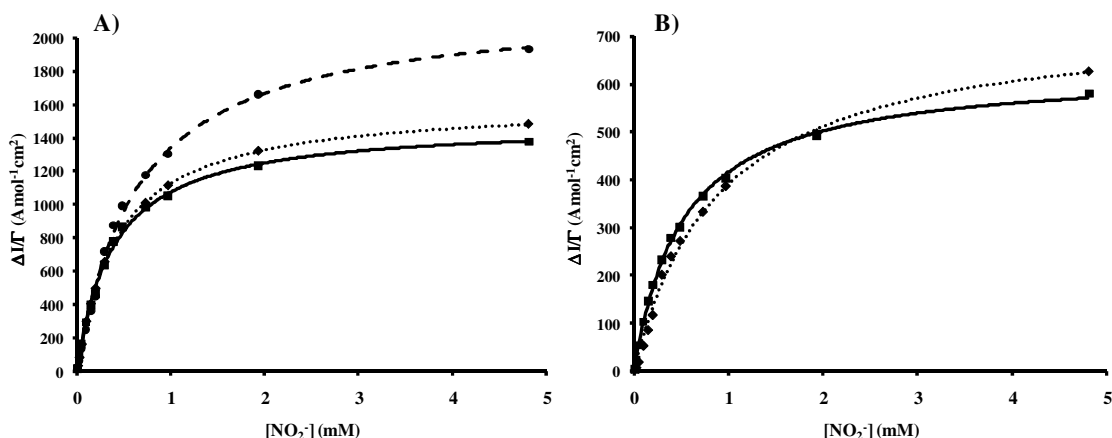
Uma nova abordagem à construção do dispositivo poderia resultar na diminuição do limite de detecção (e possível aumento da sensibilidade) para este biossensor, existindo três possibilidades evidentes passíveis de ser testadas. A primeira consiste em procurar incluir o *cit-c<sub>552</sub>* na pasta de carbono com a qual são impressos os SPEs. Assumindo que o mediador é suficientemente robusto para não sofrer desnaturação no decurso do processo, esta abordagem permitiria aumentar a concentração de ambas as proteínas no dispositivo, com a matriz de PVA a funcionar como uma barreira física à lixiviação do mediador e aumentando a sua capacidade de retenção da *cd<sub>1</sub>NiR*. Mas, como é evidente, mais proteína não garante necessariamente uma melhor resposta. Uma outra hipótese passaria pela adição de todos os elementos de modificação (enzima, mediador e PVA) à pasta de carbono, procedendo à fotopolimerização da mistura em vez de recorrer a um processo térmico. Embora bastante atractiva do ponto de vista da produção, pois resultaria num dispositivo verdadeiramente integrado construído num único passo, a optimização de um sistema deste tipo levanta diversas condicionantes experimentais, sobretudo devido à quantidade de factores a equacionar. Por último, a aplicação do sistema desenvolvido, não em macroelctrodos *screen-printed*, mas sim num sistema de *micro-array* (chip), poderia amplificar a resposta do nitrito, de forma a atingir limites de detecção inferiores.

No amperograma apresentado na figura I.31A está patente uma certa instabilidade nos valores de intensidade de corrente correspondentes à resposta ao nitrito, sendo mais pronunciada a concentrações elevadas de substrato. Este fenómeno encontra-se relacionado com a forma utilizada para homogenizar a solução após as adições de  $\text{NO}_2^-$ . Tratando-se de elctrodos *screen-printed*, não é possível proceder à rotação do elctrodo na célula electroquímica, de forma a garantir uma convecção eficiente do electrolito de suporte no decurso das medições amperométricas. Assim, para evitar limitações provocadas pelo transporte de massa, recorreu-se a um agitador magnético inserido no interior da célula, a rodar o mais rapidamente possível, mas sem causar turbulência.

Para concentrações mais baixas de substrato este sistema foi suficiente para assegurar concentrações constantes de nitrito na superfície do eléctrodo durante o decurso de cada medição. Contudo, para concentrações mais elevadas de  $\text{NO}_2^-$ , a reacção enzimática torna-se muito mais rápida, exigindo um fornecimento de substrato mais veloz na interface com o eléctrodo, o qual é limitado pela velocidade da agitação. É este o motivo pelo qual se observa uma ligeira diminuição da intensidade de corrente ao longo do tempo. Porém, considerando o valor registado imediatamente após a adição de substrato, a correlação hiperbólica entre intensidade de corrente gerada e concentração de nitrito é mantida.

#### I.4.5.3 – Influências da Temperatura e do pH

A amplitude analítica do biossensor foi avaliada em termos de dependência da temperatura e do pH. Os resultados obtidos para as curvas de calibração traçadas numa gama de temperaturas de 10 a 30°C (pH 6,3) indicam que entre os 15 e os 25°C a variação da sensibilidade é inferior a 5% (fig. I.32A). Encontra-se reportado (Lopes *et al.*, 2001) que a transferência electrónica intermolecular entre os citocromos  $c_{552}$  e  $cd_1$  apenas pode ser observada a valores de pH inferiores a 8,0. Assim, testou-se a resposta do biossensor a pH 6,7 e 8 (temperatura controlada a 25°C). Tal como se previa, ocorreu um decréscimo da sensibilidade em cerca de 30% ao transitar de pH 6,0 para pH 7,0 (fig. I.32B) e não foi observada resposta electrocatalítica a pH 8,0.



**Fig. I.32:** Resposta do biossensor a nitrito em diferentes condições de temperatura e pH. Os resultados foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten com recurso ao software GraphPad Prism v4. **A)** Temperaturas de 15 °C (linha contínua), 20 °C (linha tracejada) e 25°C (linha pontuada); **B)** Valores de pH 6,0 (traço cheio) e 7,0 (tracejado).

#### I.4.5.4 – Análise de Interferentes

A resposta do biossensor a potenciais interferentes foi estudada através da comparação entre a magnitude da resposta catalítica na presença de nitrito (100  $\mu\text{M}$ ) e a obtida após a adição de diferentes concentrações de uma outra espécie química.

O nitrato e o nitrito encontram-se presentes em simultâneo em numerosas matrizes, tanto de natureza fisiológica como ambiental, motivo pelo qual foi investigada a possível interferência por parte do nitrato. Até à concentração máxima testada (1 mM) não foi detectada actividade para com este anião.

Constatou-se também que, para o sulfato o comportamento é semelhante ao do nitrato. Porém, na presença de 1mM de sulfito ocorreu uma diminuição do sinal em 15% e, a adição de 50  $\mu\text{M}$  de hidroxilamina (um substrato alternativo *in vitro* da  $cd_1\text{NiR}$  (Allen *et al.*, 2000; van Wonderen *et al.*, 2007)) resultou num aumento da resposta em 18%. Assim, a presença destes dois compostos em amostras reais deverá ser cuidadosamente avaliado.

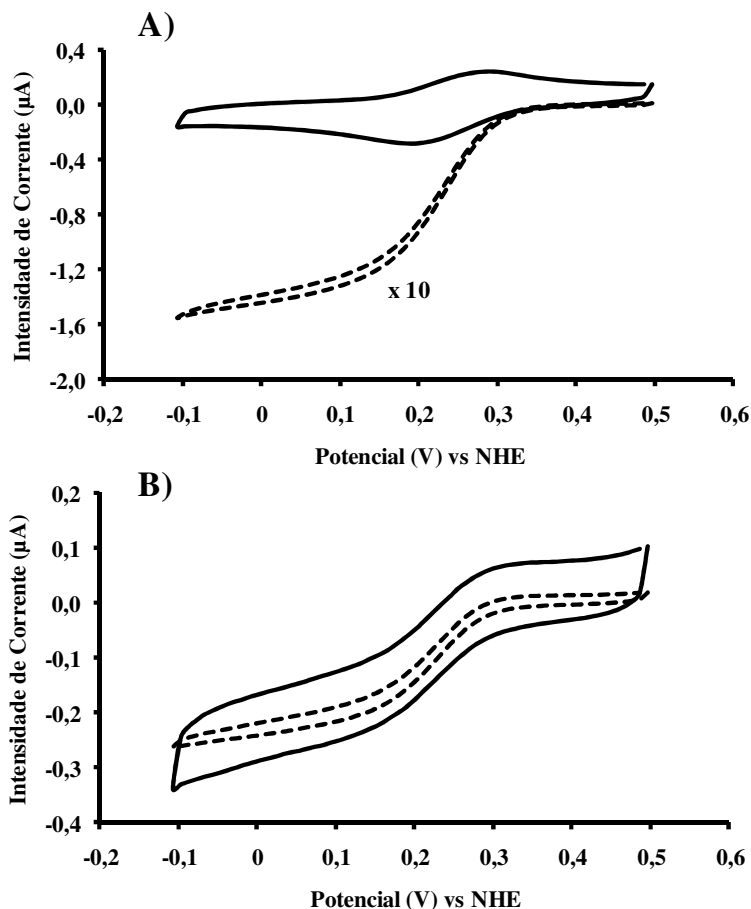
Um outro substrato reportado para a  $cd_1\text{NiR}$  é o oxigénio molecular (Centola *et al.*, 2006; Koppenhöfer *et al.*, 2000). Na verdade, foi observado um acréscimo de 20% no sinal do biossensor quando imerso numa solução não desarejada. Contudo, desenvolveu-se uma estratégia com vista a ultrapassar essa situação, a qual será apresentada de seguida.

#### I.4.5.5 – Reacção com $\text{O}_2$

Tal como foi referido anteriormente, a  $cd_1\text{NiR}$  possui a capacidade de catalisar *in vitro* a redução do oxigénio molecular (eq. 1.11). Como consequência directa deste facto, as medições amperométricas realizadas com o biossensor são vulneráveis à presença de  $\text{O}_2$  no meio.

Embora não se encontrem disponíveis os parâmetros cinéticos para a reacção com  $\text{O}_2$  da enzima de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, os resultados obtidos com a  $cd_1\text{NiR}$  da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e o seu parceiro fisiológico, o citocromo  $c_{551}$ , indicam que a constante catalítica para a redução do oxigénio (Centola *et al.*, 2006) é aproximadamente 4 vezes inferior ao valor obtido para a reacção com o nitrito (Lojou *et al.*, 2003). Assim, através da manipulação da escala de tempo (aumento da velocidade de varrimento) poderia ser possível visualizar a reacção electroquímica (passo 1 da figura I.28) sem interferência da reacção enzimática com o  $\text{O}_2$  (passo 3 da figura I.28). De facto, ao aumentar-se a velocidade de varrimento de 5 para 50  $\text{mVs}^{-1}$ , foi possível “desligar” esta via catalítica (fig. I.33A). Os voltamogramas cíclicos do cit- $c_{552}$ , obtidos na presença de  $cd_1\text{NiR}$  a velocidades de varrimento baixas, utilizado uma solução de electrólito de suporte não desarejada e sem nitrito, apresentam uma forma sigmoideal característica, sintomática da redução electrocatalítica do oxigénio dissolvido.

Porém, um voltamograma cíclico traçado nas mesmas condições experimentais mas a  $50 \text{ mVs}^{-1}$  não apresenta o mesmo aspecto catalítico.

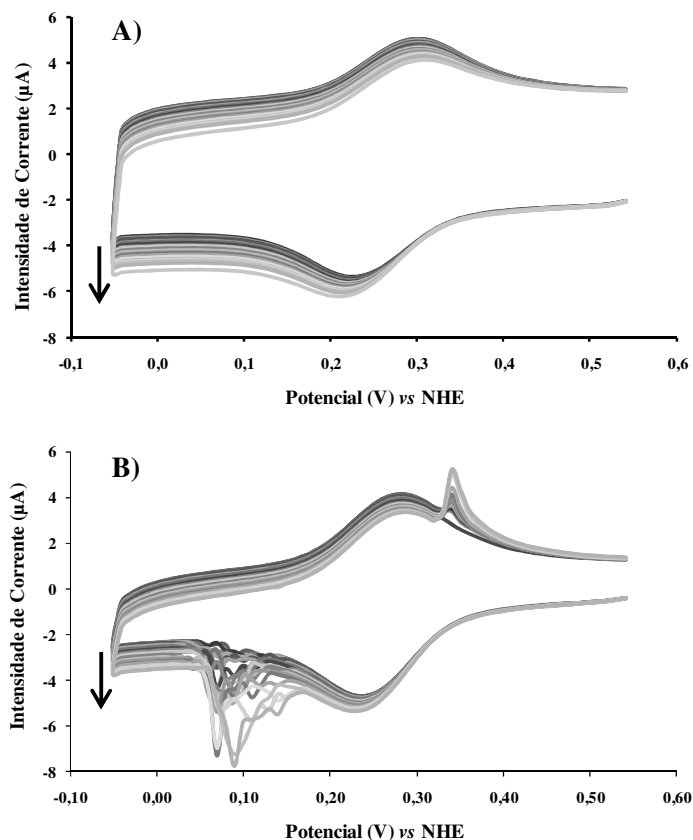


**Fig. 1.33:** Voltamogramas cíclicos traçados com o biossensor na presença de oxigénio dissolvido ou nitrito, registados a  $5 \text{ mVs}^{-1}$  (linha tracejada, as correntes foram amplificadas 10 vezes para facilitar a comparação) e  $50 \text{ mVs}^{-1}$  (linha cheia). **A)** Solução de electrólito de suporte não desarejada, sem adição de nitrito; **B)** Solução de electrólito de suporte desarejada e contendo 1 mM de nitrito.

Contudo, o contributo do transporte de massa de duas espécies distintas ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{O}_2$ ) através da matriz de PVA poderá igualmente contribuir para este comportamento distinto.

Deve-se ainda referir que, para este sistema, o mesmo princípio não pode ser aplicado na construção de um biossensor para oxigénio, capaz de funcionar na presença de nitritos. Isto porque independentemente da velocidade de varrimento, concentrações saturantes de  $\text{NO}_2^-$  resultaram sempre na obtenção de correntes catalíticas (fig. I.33B).

A manipulação da escala de tempo através da velocidade de varrimento não é passível de ser realizada por amperometria. Assim, de forma a comparar os parâmetros analíticos decorrentes da calibração do sensor na presença e ausência de oxigénio (tabela I.6), foram realizados ensaios por voltametria cíclica, cujos voltamogramas representativos se encontram na figura I.34.



**Fig. I.34:** Voltamogramas cíclicos traçados com o biossensor na presença de concentrações crescentes de nitrito (1  $\mu\text{M}$  a 1 mM). **A)** Solução de electrólito de suporte desarejada. **B)** Solução de electrólito de suporte não desarejada. Os picos agudos registados nos voltamogramas derivam de contaminantes presentes na pasta de carbono utilizada para imprimir o lote de eléctrodos.

**Tabela I.6:** Parâmetros analíticos dos sensores amperométrico e voltamétrico na ausência e na presença de  $\text{O}_2$  dissolvido no electrólito de suporte.

Parâmetros Analíticos	Sensor Amperométrico (sem $\text{O}_2$ )	Sensor Voltamétrico sem $\text{O}_2$	Sensor Voltamétrico com $\text{O}_2$
Gama de Linearidade ( $\mu\text{M}$ )	10 – 200	8 – 170	16 – 380
Limite de Detecção ( $\mu\text{M}$ )	7	1,4	1,1
Limite de Quantificação ( $\mu\text{M}$ )	24	4,8	3,7
Sensibilidade ( $\text{A mol}^{-1} \text{cm}^2 \mu\text{M}^{-1}$ )	2,49	2,70	1,60

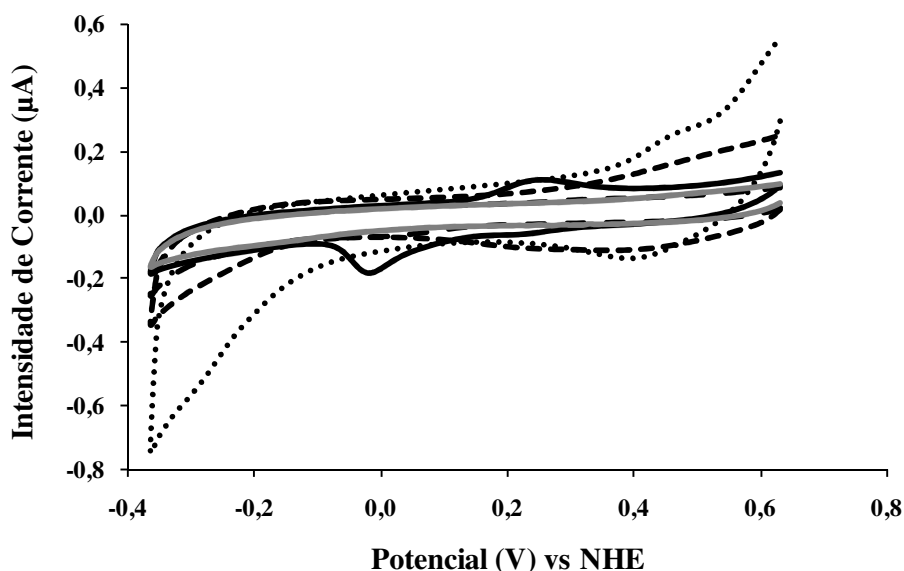
Como se pode observar a partir dos dados da tabela I.6, não existe uma diferença significativa nas gamas de linearidade obtidas para os três sistemas. Os sensores voltamétricos possuem limites de detecção e quantificação inferiores ao sensor amperométrico, contudo não diferem significativamente entre si. Assim, comprova-se a possibilidade de operação do sensor voltamétrico na presença de  $O_2$ . No que respeita à sensibilidade, esta é superior quando o sensor voltamétrico opera na presença de oxigénio molecular, facto que poderá indicar uma ligeira interferência do  $O_2$  no sistema mas que, atendendo à generalidade dos valores apresentados para os restantes parâmetros, não é limitativa.

#### **I.4.6 – Construção de um Biossensor Electroquímico Específico para Nitritos Baseado na Resposta Directa da $cd_1NiR$ num Sistema Electroquímico.**

A procura de um sistema passível de promover a interacção directa entre a  $cd_1NiR$  e o eléctrodo de trabalho, tornando desnecessário o recurso a um mediador, conduziu ao estudo da interacção directa entre esta enzima e diferentes tipos de eléctrodos. Uma estratégia que tem vindo a ser reportada com bastante sucesso com vista à obtenção de respostas electroquímicas por parte de proteínas de outro modo “silenciosas”, é o recurso a modificações das superfícies dos eléctrodos com monocamadas automontadas de compostos orgânicos (Rusling *et al.*, 2008). Assim, a interacção entre a  $cd_1NiR$  e eléctrodos de ouro policristalino modificados com diferentes SAMs foi investigada.

##### **I.4.6.1 – Selecção do Modificador de Superfície**

A primeira fase do trabalho consistiu na selecção do tiol com o qual seria modificada a superfície do eléctrodo de trabalho. Para esse efeito, foram testadas SAMs constituídas por tióis de cadeia curta e longa, funcionalizados com grupos hidrófilos, hidrofóbicos e polares, nomeadamente a cisteamina (Cs), o ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), o ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA), o 11-mercaptopundecanol (MUOH) e o 1-hexanotiol (HT). Na figura I.35 encontram-se representados os voltamogramas cíclicos obtidos após modificação do eléctrodo de trabalho com SAMs de cada um destes compostos, seguida de adsorção da  $cd_1NiR$ .



**Fig. I.35:** Selecção do modificador de superfície. Voltamogramas cíclicos traçados com o eléctrodo de trabalho modificado com diferentes SAMs e  $cd_1NiR$  adsorvida. Os voltamogramas cíclicos foram traçados a  $20 \text{ mVs}^{-1}$  em 50 mM tampão MES pH 6,3 com 150 mM KCl, o eléctrodo de trabalho foi modificado com SAMs de (••••) Cs, (- - -) MPA, (—•) MUA, (—△) MUOH e (—) HT.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura I.35 demonstram que, no eléctrodo modificado com SAMs de HT e MUOH não existe resposta da  $cd_1NiR$ . Porém, não foi possível determinar se tal ocorreu devido à proteína não adsorver nas superfícies modificadas ou se, adsorvendo, não o fez com uma orientação favorável à troca de electrões com o eléctrodo de trabalho. Para as SAMs de Cs e MPA também não foi observada resposta da enzima. Salienta-se ainda o facto de, por serem tióis de cadeia curta, cuja organização em SAM resulta num menor bloqueio da superfície, a modificação do eléctrodo com estes dois compostos produz voltamogramas com uma maior corrente capacitiva. A comunicação directa entre a proteína e o eléctrodo foi atingida através de uma interacção de natureza electrostática quando a modificação foi realizada com ácido 11-mercapto-undecanoico (MUA), um tiol de cadeia longa (11C) e grupo terminal ácido carboxílico.

De acordo com os mapas de potencial coulombiano apresentados na figura I.26, a  $cd_1NiR$  apresenta uma distribuição bastante homogénea de cargas na sua superfície, com uma clara prevalência de resíduos de natureza hidrófoba e sem nenhuma zona nitidamente positiva, que justifique a interacção electrostática a uma superfície carregada negativamente, como é o caso da SAM de MUA. Salienta-se ainda o facto de que a natureza exacta, em termos de carga superficial, da superfície modificada não foi determinada. Este parâmetro é importante porque o pKa do MUA, enquanto composto isolado (6,5), carece de validade quando este se encontra organizado numa SAM, covalentemente ligado à superfície de um eléctrodo polarizado.

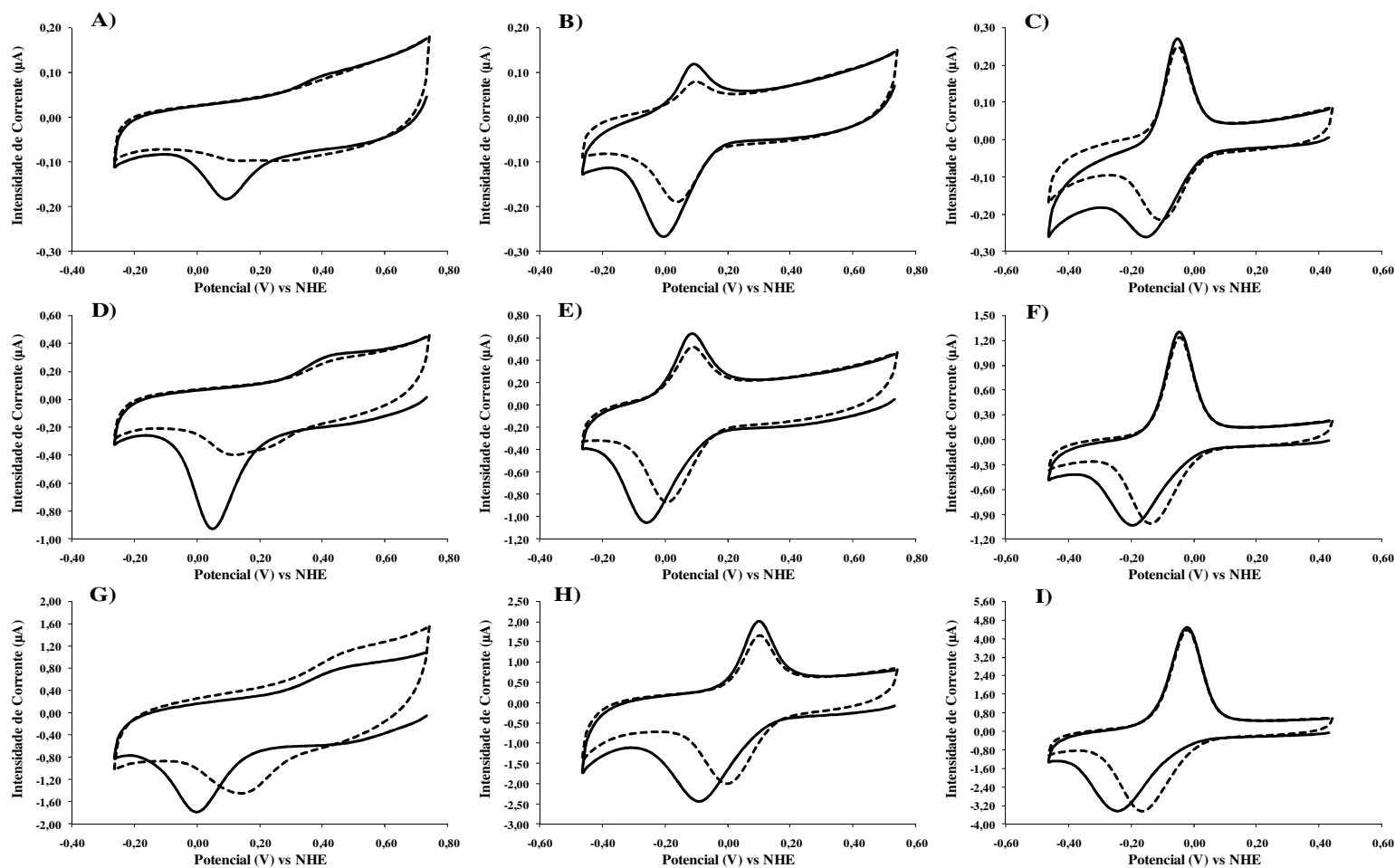


#### **I.4.6.2 – Estudo do Comportamento Electroquímico da $cd_1NiR$ Adsorvida num Eléctrodo modificado com uma SAM de MUA**

Uma vez seleccionado o modificador de superfície foram realizados ensaios voltamétricos com velocidades de varrimento ( $v$ ) compreendidas entre os 5 e os 1000  $Vs^{-1}$ , numa gama de pH de 5 a 9. Voltamogramas cíclicos obtidos em parte destas condições são apresentados na figura I.36.

Estes voltamogramas cíclicos demonstram que, de um modo geral, o comportamento da enzima neste sistema electroquímico é fortemente condicionado pelas condições de  $v$  e, sobretudo, de pH do electrólito de suporte. Assim, verifica-se que a pH 5 ocorre uma redução praticamente irreversível, mas o aumento de pH promove o surgimento de um pico de oxidação. O pico de redução observado no segundo varrimento surge sempre a um valor de potencial mais elevado do que no primeiro varrimento, sendo que esta diferença é tanto mais pronunciada quanto menores são a  $v$  e o pH. Estas observações sugerem a ocorrência de alterações estruturais na proteína aquando da redução no primeiro varrimento, cuja extensão será condicionada pelo pH do meio. Neste caso, o aumento da velocidade de varrimento impedirá a observação de tais modificações, sugerindo que se trata de um processo relativamente lento. Assim, infere-se que o sistema em estudo traduz um processo irreversível.

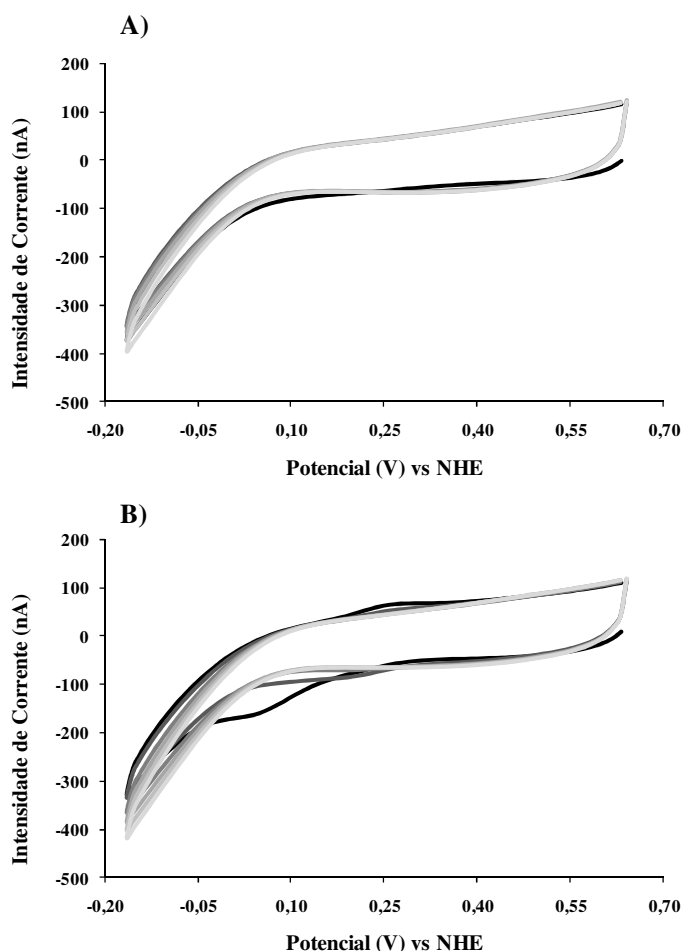
Salienta-se ainda a instabilidade do sinal, que vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo. Esta diminuição na intensidade de corrente é tanto mais acentuada quanto menor é o pH. A 20  $mVs^{-1}$  e pH 5, já não são observáveis quaisquer picos no terceiro varrimento. Este motivo, conjuntamente com as alterações irreversíveis observadas do 1º para o 2º ciclos, conduziu à necessidade de realizar uma nova preparação de eléctrodo para cada condição testada. Com o intuito de eliminar a instabilidade observada, procurou-se imobilizar a enzima na superfície da SAM, tanto por via de activação pelo método EDC/NHS, como pela formação de ligações cruzadas com glutaraldeído. Porém, nenhuma das estratégias foi bem sucedida.



**Fig. I.36:** Voltamogramas cíclicos traçados com o eléctrodo de Au modificado com a SAM de MUA e  $cd_1NiR$  adsorvida. As linhas contínuas correspondem ao 1º ciclo e as linhas tracejadas ao 2º ciclo. A) pH 5, 20  $mVs^{-1}$ ; B) pH 7, 20  $mVs^{-1}$ ; C) pH 9, 20  $mVs^{-1}$ ; D) pH 5, 100  $mVs^{-1}$ ; E) pH 7, 100  $mVs^{-1}$ ; F) pH 9, 100  $mVs^{-1}$ ; G) pH 5, 400  $mVs^{-1}$ ; H) pH 7, 400  $mVs^{-1}$ ; I) pH 9, 400  $mVs^{-1}$ .

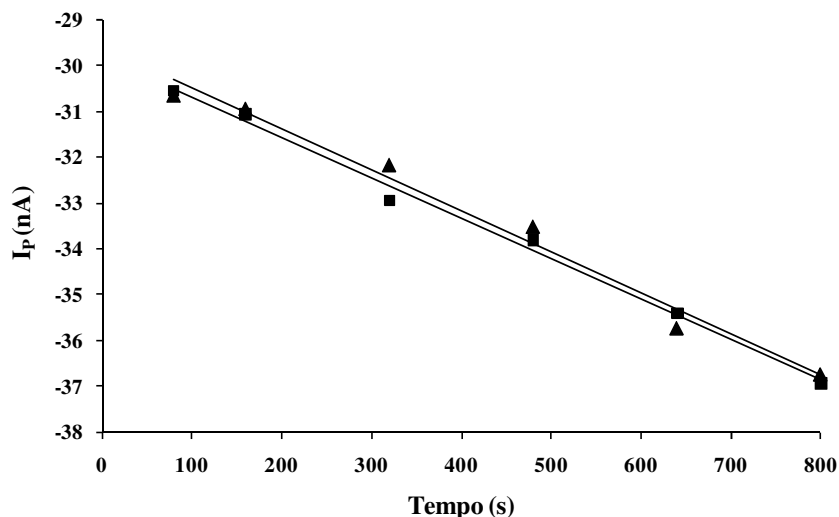
Para as diferentes condições de  $v$  e pH, procurou-se obter uma resposta catalítica na presença de nitrito, tendo sido adoptadas diferentes estratégias: adição de nitrito ao electrólito de suporte no período prévio ao ensaio, adição de nitrito ao electrólito de suporte em diferentes etapas do varrimento de potencial e incubação de nitrito conjuntamente com a proteína anteriormente à adsorção na superfície modificada do eléctrodo de trabalho. Porém, não foram observadas correntes catalíticas em nenhuma das situações testadas.

Procurou-se ainda determinar se, embora sem actividade catalítica para nitrito, a  $cd_1NiR$  adsorvida possuía a capacidade para proceder à redução do oxigénio molecular. Os voltamogramas cíclicos seguidamente apresentados (figura I.37), resultantes de experiências realizadas em soluções não desarejadas, comprovam a ausência de actividade também para este substrato.



**Fig. I.37:** Voltamogramas cíclicos, traçados ao longo do tempo, a  $20 \text{ mVs}^{-1}$  em 50 mM tampão MES pH 6,3 com 150 mM KCl, na presença de  $O_2$ . Os voltamogramas a negro correspondem ao primeiro varrimento e os cinza mais claros ao décimo varrimento. **A)** Eléctrodo de trabalho modificado com SAM de MUA. **B)** Eléctrodo de trabalho modificado com SAM de MUA e com  $cd_1NiR$  adsorvida na superfície.

A percepção da existência, ou não, de correntes de redução de natureza catalítica foi dificultada pelo sinal de redução directa do oxigénio molecular, o qual surge a partir dos 0 mV vs NHE. A comparação entre a variação da intensidade de corrente gerada no ponto de inversão ao longo do tempo, para o eléctrodo modificado com a SAM de MUA, na presença e na ausência de  $cd_1NiR$  adsorvida foi então realizada, com o intuito de esclarecer esta dúvida. Os resultados deste estudo encontram-se representados na figura I.38.



**Fig. I.38:** Variação da intensidade de corrente, medida no ponto de inversão, em função do tempo. Voltamogramas traçados a  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , em 50 mM MES pH 6,3 com 150 mM KCl, na presença de oxigénio dissolvido (soluções não desarejadas). (▲) Controlo, eléctrodo de trabalho modificado com SAM de MUA ( $y = -0,0090x - 29,582$ ;  $R^2 = 0,984$ ). (■) Ensaio, eléctrodo de trabalho modificado com SAM de MUA e  $cd_1NiR$  adsorvida ( $y = -0,0088x - 29,805$ ;  $R^2 = 0,994$ ).

Os resultados representados no gráfico da figura I.38 demonstram que as rectas obtidas no controlo sem proteína e no ensaio são praticamente coincidentes. Tal indica que apenas ocorreu a redução directa, no eléctrodo de trabalho, do oxigénio molecular dissolvido no electrólito de suporte, sem que a reacção fosse catalisada pela  $cd_1NiR$ .

Na ausência de catálise para ambos os substratos estudados (nitrito e oxigénio) procedeu-se então ao estudo do sistema electroquímico apresentado, na ausência de substrato. A complexidade deste conduziu à necessidade de assumir pressupostos, os quais foram sujeitos a verificação através da análise que se segue.

#### I.4.6.2.1 – Electrões Transferidos e Adsorção

Tal como foi referido anteriormente, a variação do sinal electroquímico produzido pela proteína, traduzida pelas alterações do primeiro para o segundo ciclos de varrimento e subsequente perda de sinal, conduziu à necessidade de efectuar as experiências de forma independente. Ou seja, para cada uma das condições de  $v$  e pH foi preparado um novo eléctrodo de trabalho. Assim, o tratamento dos resultados obtidos só foi possível procedendo à normalização dos mesmos.

Assumindo que a  $cd_1NiR$  se encontra adsorvida na superfície do eléctrodo modificado via interacção electrostática, o sistema foi tratado de acordo com as equações que regem a voltametria cíclica de proteínas adsorvidas.

De acordo com as previsões deste modelo, os voltamogramas cíclicos deveriam apresentar picos de redução e oxidação simétricos, com valores absolutos iguais quer na intensidade, quer no potencial dos picos. Ou seja,  $I_{pa} = |I_{pc}|$  e  $E_{pa} = |E_{pc}| = E^0$ . Nestas condições, a largura a meia altura dos picos ( $W_{1/2}$ ) seria de  $90,6/n$  mV a  $25^\circ C$ , sendo  $n$  o números de electrões transferidos. Assumindo que  $\Delta E_p \rightarrow 0$ , considera-se que o potencial formal da espécie consiste no valor médio entre os potenciais de pico.

Ainda de acordo com o mesmo modelo, o valor do integral para cada pico corresponde á carga ( $Q$ ). Por aplicação da lei de Faraday (eq. 1.12) onde  $\Gamma$  é a cobertura (concentração total de espécie electroactiva na superfície) em  $molcm^{-2}$ ,  $A$  é a área do eléctrodo em  $cm^2$ ,  $F$  é a constante de Faraday ( $96\,487\,Cmol^{-1}$ ) e  $n$  é o número de electrões transferidos, é possível determinar o valor de  $\Gamma$ .

$$Q = nFA\Gamma \quad (1.12)$$

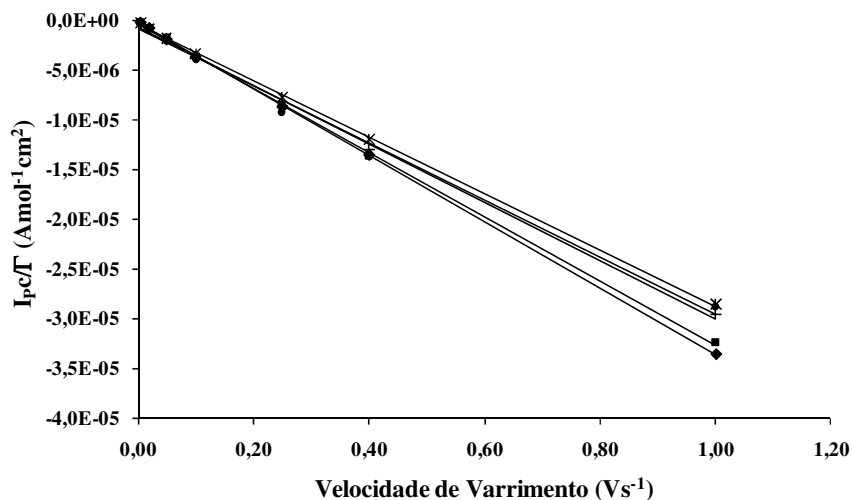
Num sistema ideal, a corrente de pico reversível ( $I_p$ ) para um filme fino electroactivo reversível aplicado num eléctrodo é directamente proporcional a  $v$ , de acordo com a equação 1.13, onde  $R$  é a constante dos gases perfeitos e  $T$  a temperatura em Kelvin.

$$I_p = n^2 F^2 A \Gamma v / 4RT \quad (1.13)$$

Assim, o quociente entre o valor da corrente gerada no pico e a cobertura produz a normalização necessária ao tratamento dos resultados, sendo que para tal se torna necessária a determinação prévia do número de electrões transferidos.

Para o sistema em estudo, foi obtido um valor médio de  $W_{1/2}$ , para o pico catódico, de  $173 \pm 21$  mV, o qual representa um desvio de cerca de 80 mV relativamente ao valor teorizado pelo modelo, para a transferência de um electrão. Tal como foi referido anteriormente, nos voltamogramas cíclicos apresentados na figura I.36 verifica-se, particularmente a pH 5, uma alteração na forma e na posição do pico de redução do primeiro para o segundo ciclo, no qual aparenta surgir uma desconvolução do pico de redução (fig. I.36A e I.36D). Aliando a esta observação a tendência verificada para o aumento da  $W_{1/2}$  com o aumento de  $v$ , para todos os valores de pH, é possível sugerir que o valor atípico obtido para  $W_{1/2}$  advém de uma contribuição de ambos os *hemos* ( $c$  e  $d_1$ ) na transferência electrónica de um electrão para a proteína.

O rearranjo da equação 1.13, com vista á normalização dos valores de intensidade de corrente ( $I_p/\Gamma = n^2 F^2 A v / 4RT$ ), foi utilizado para traçar os gráficos de  $I_{pc}$  (normalizado) vs  $v$  que se apresentam na figura I.39.



**Fig. I.39:** Relação entre as intensidades de corrente e as velocidades de varrimento dos picos catódicos. (●) pH 5 ( $y = -3 \times 10^{-5}x - 9 \times 10^{-7}$ ;  $R^2 = 0,9923$ ), (■) pH 6 ( $y = -3 \times 10^{-5}x - 3 \times 10^{-7}$ ;  $R^2 = 0,9996$ ), (+) pH 7 ( $y = -3 \times 10^{-5}x - 6 \times 10^{-7}$ ;  $R^2 = 0,9979$ ), (\*) pH 8 ( $y = -3 \times 10^{-5}x - 4 \times 10^{-7}$ ;  $R^2 = 0,9994$ ) e (◆) pH 9 ( $y = -3 \times 10^{-5}x - 2 \times 10^{-7}$ ;  $R^2 = 0,9999$ ).

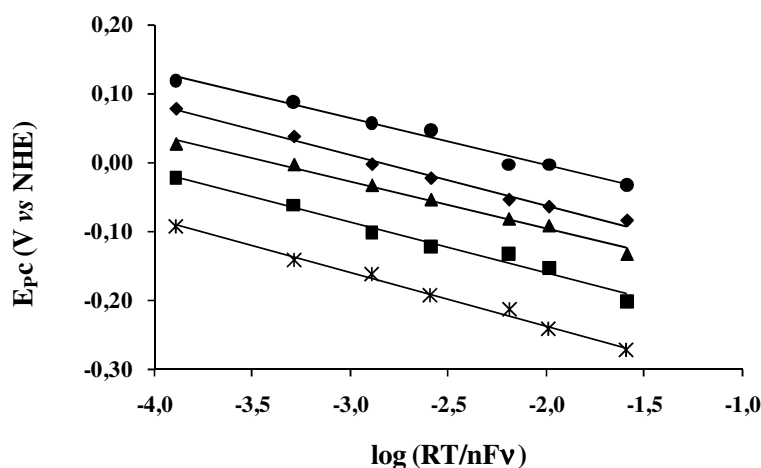
De acordo com os resultados da figura I.39, verifica-se que existe efectivamente uma relação de proporcionalidade directa entre  $I_{pc}$  e  $v$ , para todos os valores de pH. No caso dos picos anódicos não se verificou a existência de uma relação linear entre  $I_{pa}$  e  $v$  ( $R^2 < 0,98$ ) contudo, ao aplicar os valores das correntes dos picos anódicos ao modelo alternativo (proteína em solução) o qual prevê a existência de uma relação linear entre  $I_p$  e  $\sqrt{v}$ , os resultados foram ainda mais dispares, com coeficientes de correlação inferiores a 0,95.

Assim, conclui-se que o modelo de espécie electroactiva adsorvida foi correctamente aplicado ao sistema em estudo.

#### I.4.6.2.2 – Coeficiente de Transferência de Carga ( $\alpha$ ) e Constante de Transferência Electrónica Heterogénea ( $k_s$ )

Tendo sido verificada a existência de uma relação de proporcionalidade directa encontrada entre os  $E_{pc}$  e  $\log(v)$  (fig. I.40) foi possível realizar o cálculo de  $\alpha$  e  $k_s$  para o processo catódico, com base na equação 1.14 (Zhao *et al.*, 2002). Por aplicação desta equação a cada uma das rectas apresentadas na figura I.40, traçadas a valores de pH diferentes, obteve-se para  $\alpha$  o valor médio de  $0,54 \pm 0,02$  e para  $k_s$  os valores apresentados na tabela I.7.

$$\log(k_s) = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log(\alpha) - \log\left(\frac{RT}{nFv}\right) - \left(\frac{\alpha(1 - \alpha)nFE_{pc}}{2,303RT}\right) \quad (1.14)$$

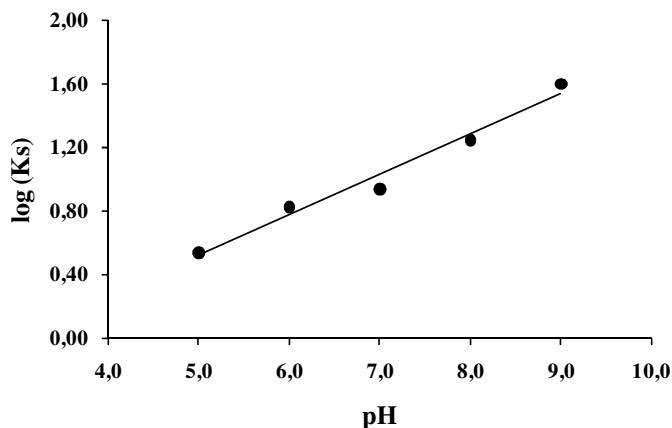


**Fig. I.40:** Relação entre os potenciais dos picos catódicos e o logaritmo da velocidade de varrimento. Os pontos experimentais representados correspondem a: (●) pH 5, (◆) pH 6, (▲) pH 7, (■) pH 8 e (\*) pH 9.

**Tabela I.7:** Constantes de transferência electrónica heterogénica ( $k_s$ ) da  $cd_1NiR$  a diferentes valores de pH.

pH	$k_s$ ( $s^{-1}$ )
5	3,4
6	6,6
7	8,5
8	17,5
9	39,6

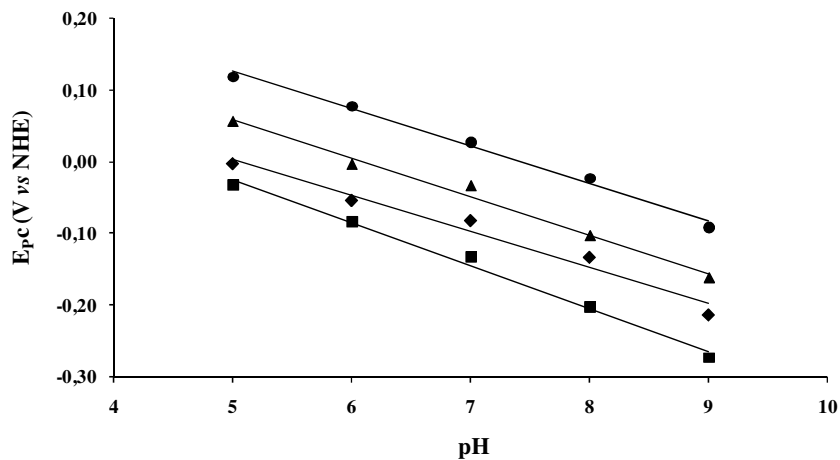
No caso da constante de transferência electrónica, verificou-se que esta varia linearmente com o aumento do pH, como se pode verificar pelo gráfico da figura I.41. Facto que aponta para a ocorrência de uma reacção química acoplada à transferência electrónica, mais concretamente, uma transferência protónica (Léger & Bertrand, 2008).



**Fig. I.41:** Relação entre log Ks e pH para os potenciais dos picos catódicos.

#### I.4.6.2.3 – Reacção Química Acoplada – Transferência de Protões

Tendo sido verificada a existência de uma relação linear entre os  $E_{pc}$  e o pH, para todas as  $v$  estudadas (fig. I.42), foi calculado o número de protões transferidos no decurso do processo.



**Fig. I.42:** Relação entre  $E_{pc}$  e pH para algumas das  $v$  estudadas. Os pontos experimentais representados correspondem a: (●) 5 mVs<sup>-1</sup>, (▲) 50 mVs<sup>-1</sup>, (◆) 250 mVs<sup>-1</sup> e (■) 1 Vs<sup>-1</sup>.



Assumindo que a variação máxima de  $E_p$  por unidade de pH é fornecida pela relação 1.15, onde  $m$  representa o número de  $H^+$  transferidos (Léger & Bertrand, 2008), procedeu-se ao cálculo de  $m$ , a partir dos declives das rectas obtidas a cada uma das v.

$$\frac{2,303RT}{F} \times \frac{m}{n} (V) / pH \quad (1.15)$$

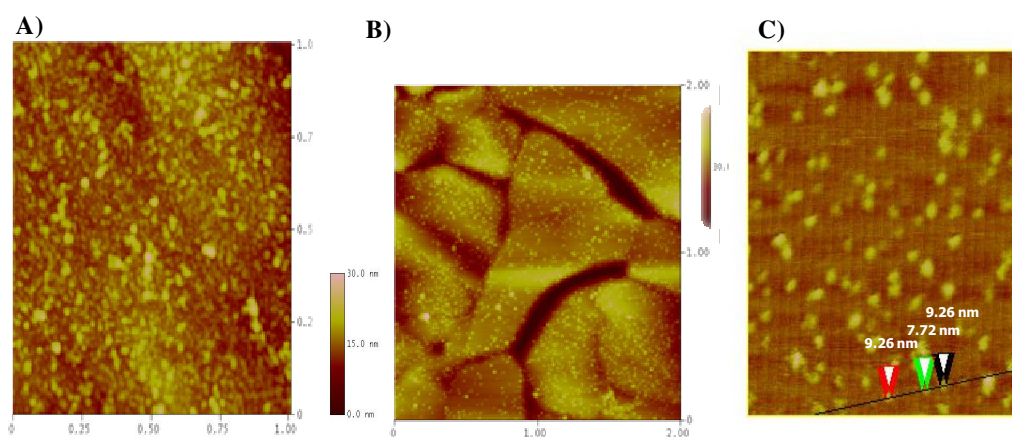
Assim, com um valor de  $m$  de  $0,93 \pm 0,06$ , determinou-se que o processo electroquímico de transferência de 1 electrão é acompanhado por um processo químico que envolve a transferência de 1 protão.

Os resultados obtidos apontam então para a ocorrência de um processo de redução envolvendo a transferência de um electrão, seguido de uma reacção química de desprotonação.

A organização da enzima na superfície modificada do eléctrodo de trabalho, foi estudada com recurso a imagens adquiridas por microscopia de força atómica (AFM- *atomic force microscopy*) de superfícies análogas às utilizadas nas experiencias electroquímicas.

#### I.4.6.3 – Microscopia de Força Atómica

As imagens de superfície de placas de Au monocristalino (111), submetidas ao mesmo processo de modificação e adsorção da proteína que o eléctrodo de trabalho original, e recolhidas por microscopia de força atómica apresentam-se na figura I.43.



**Fig. I.43:** Imagens de AFM de **A)** Au modificado com MUA e  $cd_1NiR$  adsorvido; **B)** Au modificado com MUA; **C)**  $cd_1NiR$  adsorvida em mica.

As entidades apresentadas na imagem da figura I.43C possuem dimensões consistentes com a  $cd_1NiR$  e a heterogeneidade da superfície apresentada na imagem da figura I.43B revela que o MUA se encontra adsorvido na superfície de Au em multicamadas, e não em monocamada como era pretendido. Assim, as imagens apresentadas na figura I.43A demonstram que a proteína se encontra adsorvida na superfície do eléctrodo com um empacotamento bastante denso. Este fenómeno poderia ser a causa para a ausência de actividade catalítica observada, atendendo a que poderia impossibilitar o acesso do substrato ao centro activo da enzima.

Com o intuito de reduzir o empacotamento da  $cd_1NiR$  quando adsorvido, de forma a fomentar o acesso do nitrito ao centro activo, foram preparadas SAMs mistas de MUA com MUOH e MUNE, cujos resultados se apresentam em seguida.

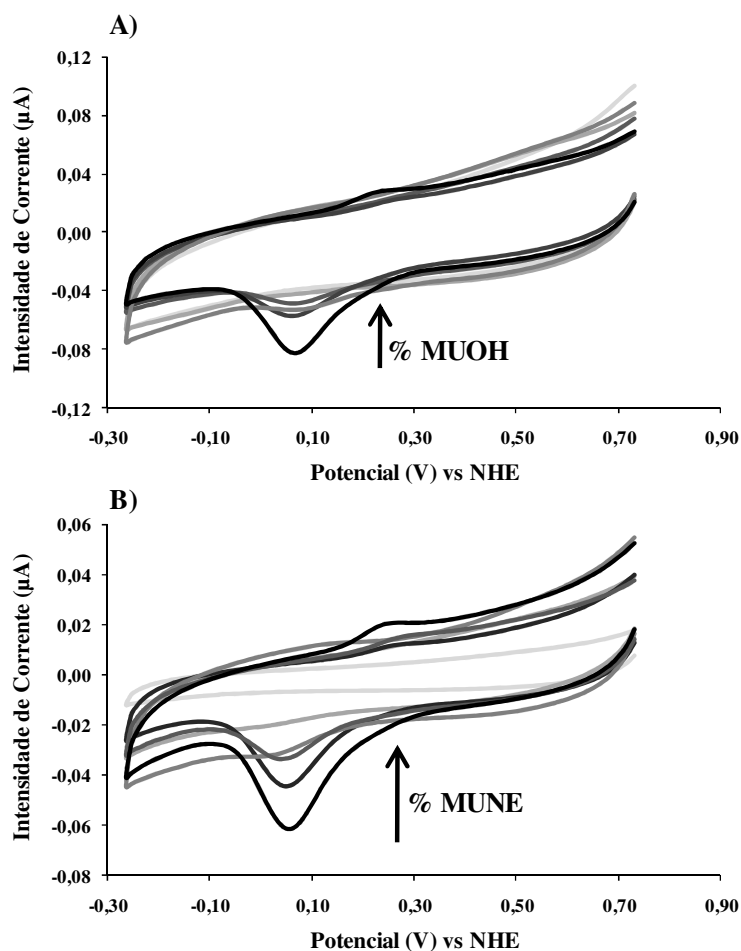
#### **I.4.6.4 – Estudo do Comportamento Electroquímico da $cd_1NiR$ Adsorvida num Eléctrodo modificado com SAMs Mistas**

A preparação de eléctrodos modificados com SAMs mistas compostas por MUA (ao qual a  $cd_1NiR$  adsorve) e tióis com cadeias alifáticas de comprimento semelhante, mas com terminações hidrófila (MUOH) ou hidrofóbica (MUNE), em diferentes proporções, visava a criação de espaços entre as moléculas de proteína adsorvida, de forma a permitir o acesso do substrato e eliminar eventuais constrangimentos resultantes de uma excessiva proximidade entre moléculas.

Os voltamogramas cíclicos, correspondentes ao primeiro varrimento de potencial, obtidos com estas preparações, na ausência de nitrito, encontram-se representados na figura I.44. Os resultados apresentados demonstram claramente que a intensidade de corrente gerada pela redução da  $cd_1NiR$  decresce de modo proporcional á diminuição da percentagem de MUA nas SAMs mistas, independentemente do tiol seleccionado para funcionar como intercalador. Tal facto indica que esta estratégia permite reduzir a quantidade de moléculas de proteína adsorvidas na superfície do eléctrodo, tal como se pretendia, tendo porém a desvantagem de as correntes geradas serem igualmente inferiores.

Todos os ensaios apresentados foram repetidos em soluções de electrólito contendo 1mM de nitrito. Porém os resultados obtidos foram semelhantes aos representados na figura I.44, não tendo sido observadas quaisquer correntes catalíticas.

Não se tratando de um problema de acesso do substrato, existe ainda a hipótese de a proteína se encontrar adsorvida com uma orientação desfavorável á correcta interacção com o eléctrodo de trabalho, com o electrão transferido a realizar um percurso diferente daquele que ocorre na presença do cit- $c_{552}$  enquanto parceiro redox. Contudo, os resultados obtidos, mesmo considerando a conjugação de todas as técnicas empregues, são claramente insuficientes para permitir realizar uma proposta fundamentada sobre o percurso do electrão transferido para a proteína e de quais são as alterações que a redução provoca na mesma.



**Fig. I.44:** Eléctrodos modificados com SAMs mistas. Voltamogramas cíclicos traçados a  $20\text{mVs}^{-1}$  em 50 mM tampão MES pH 6,3 com 150mM KCl. **A)** Eléctrodo de trabalho de Au modificado com SAMs mistas de MUA e MUOH. A gradação de cor indica a variação na percentagem de MUOH, correspondendo o negro a 0% MUOH e o cinzento mais claro a 100% MUOH. **B)** Eléctrodo de trabalho de Au modificado com SAMs mistas de MUA e MUNE. A gradação de cor indica a variação na percentagem de MUNE, correspondendo o negro a 0% MUNE e o cinzento mais claro a 100% MUNE.

A irreversibilidade do processo electroquímico e a ausência de catálise em todas as condições testadas são factores que apontam para a ocorrência de modificações conformacionais na enzima, provavelmente decorrentes da sua interacção com a SAM de MUA. Uma vez que as técnicas electroquímicas clássicas não possibilitam a aquisição de dados suficientes para clarificar este ponto, recorreu-se á Espectroscopia de Ressonância Raman (RR – *Raman Resonance*) como forma de atestar a integridade estrutural da  $cd_1NiR$  em solução, bem como esclarecer a natureza e implicações da interacção entre a proteína e o modificador de superfície através de Ressonância Raman Amplificada por Superfície (SERR – *Surface Enhanced Raman Resonance*).

#### I.4.6.5 – Ressonância Raman

Um trabalho pioneiro realizado em 1981 por Cotton *et al.*, elege a  $cd_1NiR$  como a biomolécula ideal para a insidência de estudos de espectroscopia de Ressonância Raman. Isso porque a existência de dois grupos hémicos com propriedades de absorção electrónica distintas, permite excitar selectivamente a dispersão de RR dos *hemos c* ou *d<sub>I</sub>*.

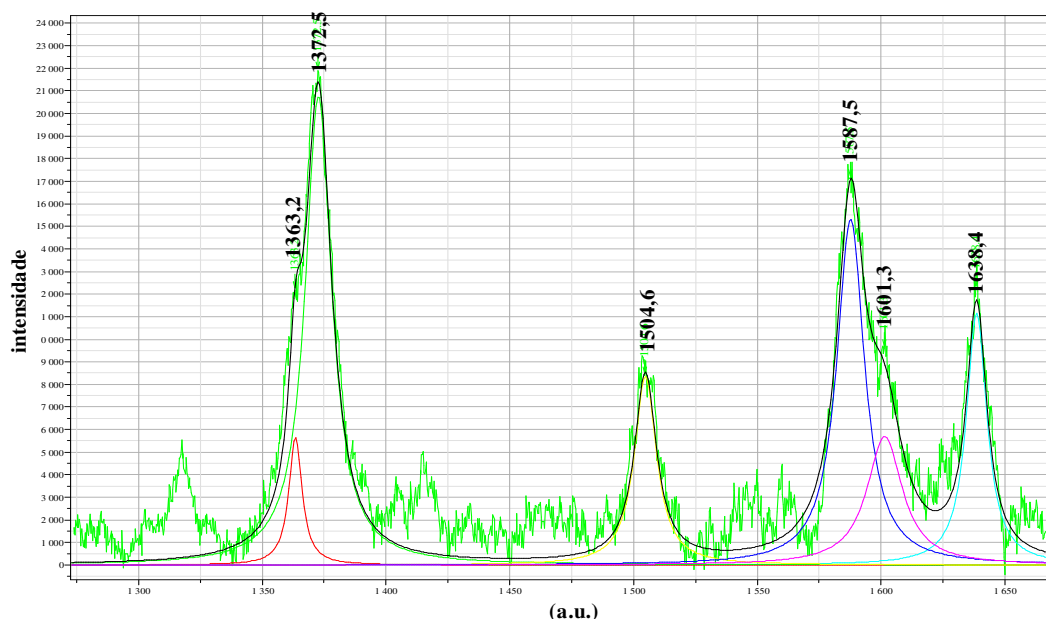
Nesse trabalho, foram recolhidos os primeiros espectros RR da  $cd_1NiR$  de *Ps. aeruginosa* e *P. denitrificans*, embora apenas a proteína reduzida tenha produzido resultados com qualidade suficiente para análise. Igualmente, foram realizadas as primeiras experiências de Ressonância Raman Amplificada por Superfície (SERR) com esta enzima.

Três décadas de evolução científica e tecnológica permitem agora retomar a utilização destas técnicas, com a expectativa fundamentada de obter mais e melhores resultados. Hoje em dia é possível realizar uma melhor caracterização espectroscópica dos *hemos*, tanto no estado reduzido quanto oxidado, com a melhor distinção entre as bandas relativas aos dois centros, promovida pela capacidade de proceder a excitações a 647nm. A modificação das superfícies dos eléctrodos utilizados em SERR e a capacidade de realizar titulações redox por esta via são igualmente novas funcionalidades a explorar.

##### I.4.6.5.1 – Espectroscopia de Ressonância Raman

As regiões de altas frequências dos espectros de RR adquiridos com a  $cd_1NiR$ , nos estados férrico (nativo) e ferroso (após redução com ascorbato), encontram-se nas figuras I.45 e I.46, respectivamente.

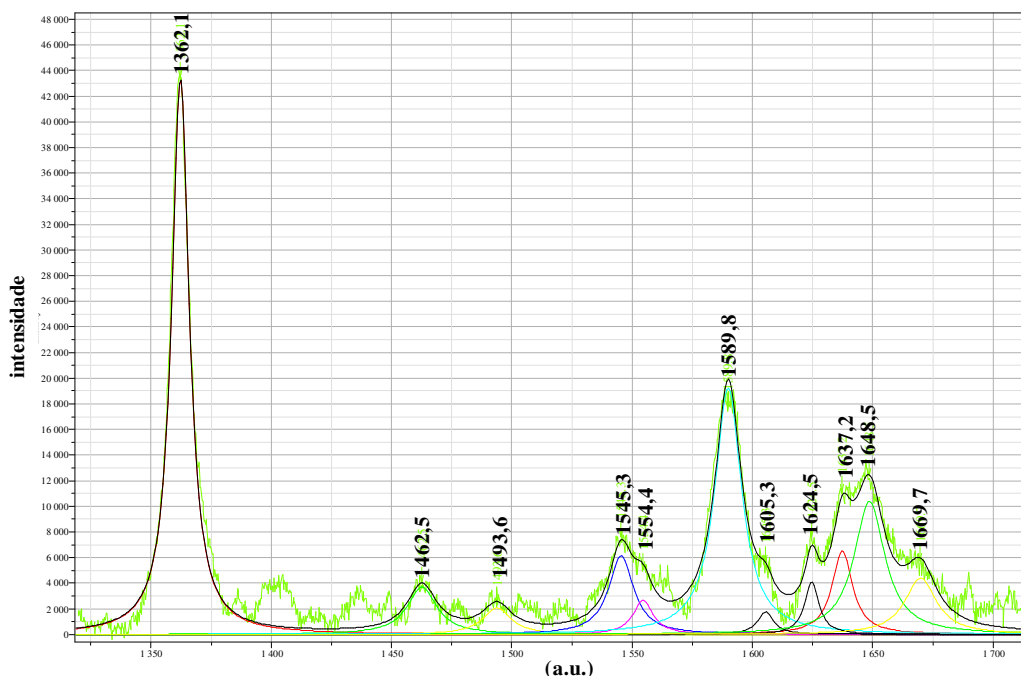
Os espectros RR da  $cd_1NiR$  no estado nativo (fig. I.45), obtidos com excitação a 413nm, contêm contribuições dos dois *hemos*, dado que os máximos das bandas de Soret dos dois grupos hémicos se sobrepõem.



**Fig. I.45:** Região de altas frequências dos espectros de Ressonância Raman da *cd*<sub>1</sub>NiR no estado oxidado. Espectros adquiridos com 150  $\mu$ M de proteína, excitação a 413nm e 60 segundos de tempo de acumulação.

A análise da região de altas frequências revela que o modo  $\nu_3$ , que corresponde à frequência do estado de spin (e estado de oxidação), se encontra a  $1504\text{cm}^{-1}$ . Esta observação permite concluir directamente que ambos os *hemos* da proteína se encontram no estado 6cLS (hexacoordenado, baixo spin). A configuração de baixo spin dos grupos hémicos é ainda corroborada pelas frequências vibracionais das restantes bandas a eles atribuídas, particularmente as frequências de  $\nu_2$ ,  $\nu_{37}$  e  $\nu_{10}$  que estariam significativamente desviadas para valores mais elevados caso a proteína fosse uma espécie 5cHS (pentacoordenado, alto spin).

Podem ser observados no espectro RR dois componentes da banda  $\nu_4$  (marcador do estado redox) associados às formas férrica ( $1372\text{ cm}^{-1}$ ) e ferrosa ( $1362\text{ cm}^{-1}$ ) da proteína. A banda característica de um *hemo* ferroso surgiu no espectro independentemente da potência de laser ou do tempo de acumulação utilizados, sendo que a sua intensidade aumentava de forma proporcional com o aumento destes dois parâmetros. Concluiu-se, assim, que uma pequena população de enzima se encontra num estado foto-reduzido e, consequentemente, todos os espectros apresentados representam um compromisso entre uma razão sinal/ruído razoável e a tentativa de minimizar a foto-redução.



**Fig. I.46:** Região de altas frequências dos espectros de Ressonância Raman da *cd<sub>1</sub>NiR* após redução com ascorbato. Espectros adquiridos com 150  $\mu$ M de proteína, excitação a 413nm e 60 segundos de tempo de acumulação.

O modo  $\nu_4$  bem definido e simétrico que se observa nos espectros RR da enzima reduzida com ascorbato (fig.I.46) demonstra que a proteína foi totalmente reduzida. Mais, podem ainda ser identificadas nos espectros duas espécies ferrosas distintas com base na presença de dois modos  $\nu_3$  a 1463 e 1493  $\text{cm}^{-1}$  e  $\nu_{10}$  a 1605 e 1624  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos a populações alto spin e baixo spin respectivamente. A largura da banda correspondente ao modo  $\nu_2$  indica também a presença de duas bandas não resolvidas.

O modo a 1667 $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao C=O *stretching* da espécie ferrosa 5cHS. A vibração C=O *stretching* é uma “impressão digital” do *hemo d<sub>1</sub>* e as evidências sugerem que este sofre uma transição do estado de spin aquando a redução da proteína.

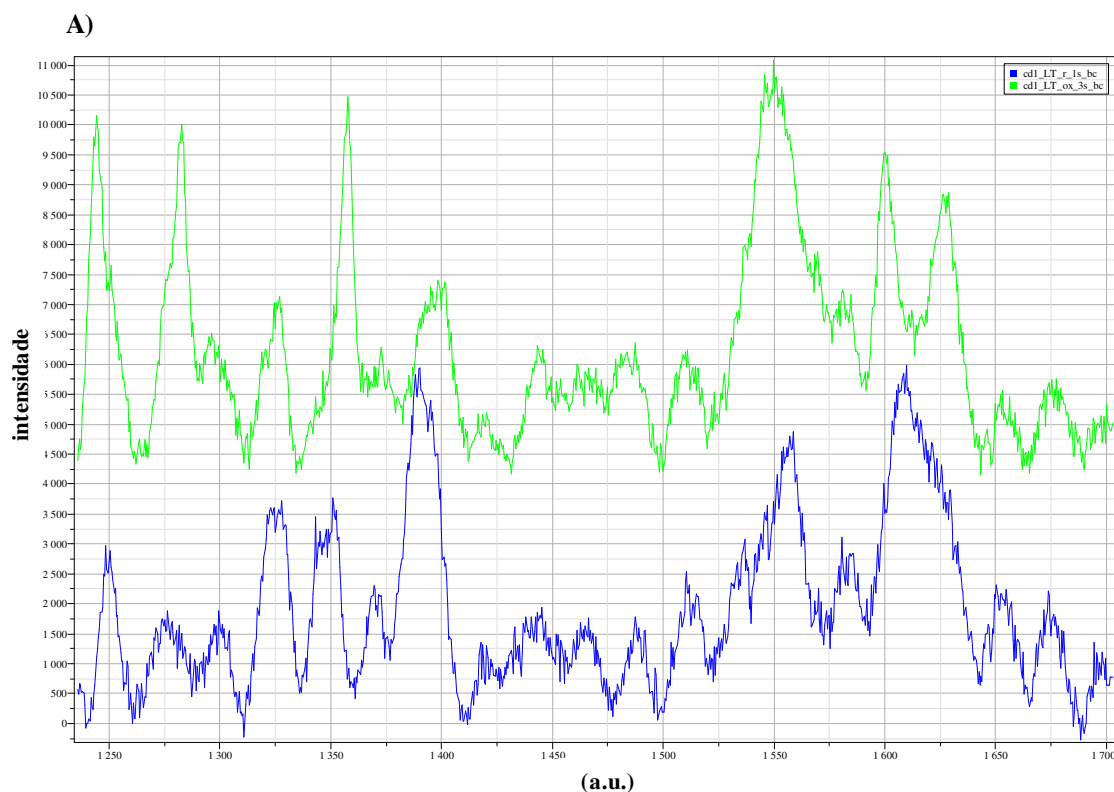
Na tabela I.8 encontram-se registados os modos vibracionais de RR atribuídos para a *cd<sub>1</sub>NiR* nos estados férrico e ferroso. Os modos presentes nos espectros das figuras I.45 e I.46 que não se encontram atribuídos foram excluídos da tabela.

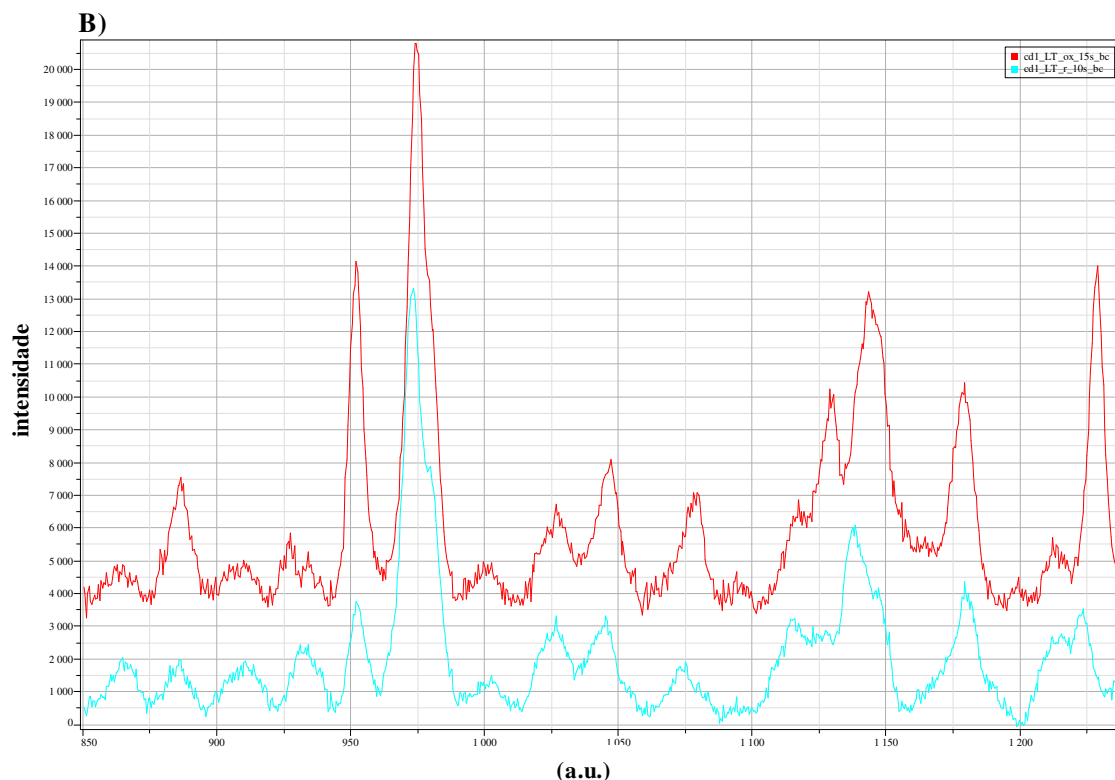
**Tabela I.8:** Modos vibracionais de Ressonância Raman da  $cd_1NiR$  nos estados oxidado e reduzido.

Modo	estado oxidado ( $cm^{-1}$ )	estado reduzido ( $cm^{-1}$ )
$\nu_4$	1372	1362
$\nu_3$	1504 (6cLS)	1463 (5cHS); 1493 (6cLS)
$\nu_2$	1587 (6cLS)	1590 (5cHS+ 6cLS)
$\nu_{37}$	1601 (6cLS)	
$\nu_{10}$	1638 (6cLS)	1605 (5cHS); 1624 (6cLS)
C=O		1667

Comprova-se assim que, no estado oxidado, ambos os *hemos* da  $cd_1NiR$  se encontram hexacoordenados, com o Fe(III) no estado de baixo spin. Como consequência da redução, o *hemo d<sub>1</sub>* liberta um ligando, tornando-se pentacoordenado, isto é com o Fe(II) no estado de alto spin. Estes resultados são concordantes com os obtidos por MCD (Walsh *et al.*, 1979), NMR (Timkovich & Robinson, 1979) e EPR (Muhoherac & Wharton, 1983) para a proteína de *Ps. aeruginosa*.

De modo a proceder à ampliação selectiva dos modos vibracionais pertencentes ao *hemo d<sub>1</sub>*, realizou-se a excitação a 647nm, que está em ressonância com as bandas electrónicas  $\lambda_{630-640nm}$ , e que conduziu à obtenção dos espectros RR apresentados na figura I.47.





**Fig. 1.47:** Espectros RR da *cd1NiR* adquiridos com excitação a 647nm. **A)** Região de altas frequências (1230- 1700  $\text{cm}^{-1}$ ), **B)** Região de baixas frequências (850-1240  $\text{cm}^{-1}$ ). Em ambos os espectros as linhas superiores representam a proteína no estado oxidado e as linhas inferiores no estado reduzido.

Como se pode observar nas imagens da figura I.47, os espectros RR obtidos por excitação a este comprimento de onda são bastante complexos. Tal deve-se ao reduzido grau de simetria da clorina, tanto na forma oxidada como na forma reduzida da enzima. Foi contudo, possível identificar diversas bandas sensíveis ao estado de oxidação, as quais irão permitir a análise de espectros SERR dependentes do potencial, num futuro próximo. As bandas marcadoras redox mais proeminentes são, para a forma oxidada, a 1228, 1244, 1283, 1357, 1548 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  e, para a forma reduzida a 1344, 1352, 1389 e 1608  $\text{cm}^{-1}$ .

#### I.4.6.5.2 – Ressonância Raman Amplificada por Superfície

A imobilização da proteína num eléctrodo de Ag e subsequente realização de uma titulação potenciométrica seguida por SERR permitiu a obtenção de resultados que, embora preliminares, podem porém ser considerados bastante promissores.

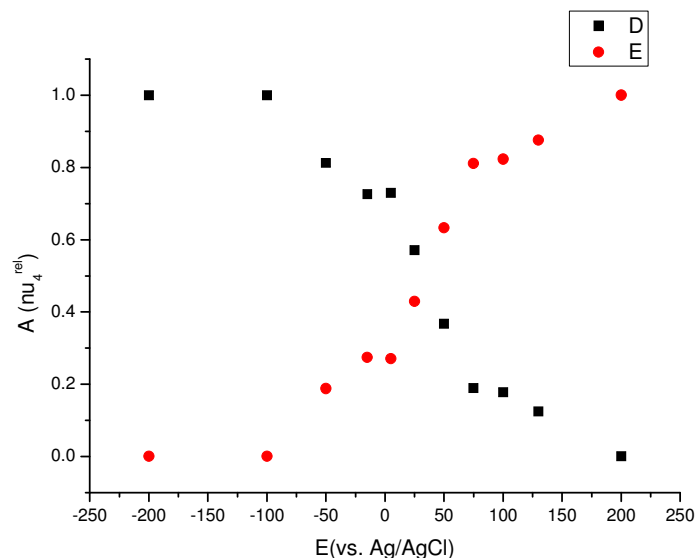


As diferentes condições de imobilização testadas, falharam ao nível da estabilidade, impossibilitando a realização de medições completas. Na maioria dos casos, a proteína encontrava-se imobilizada mas inactiva do ponto de vista redox ou então desadsorvia rapidamente, uma vez iniciado o processo de titulação potenciométrica.

A imobilização por deposição em eléctrodos revestidos com camadas de surfactante ou ácido cólico conduziu à obtenção de espectros redox reversíveis, contudo apenas numa janela de potencial reduzida. Atendo a que, neste tipo de abordagem, não é possível controlar quer a orientação da *cd<sub>1</sub>NiR*, quer a espessura da camada de proteína, foi necessária a aplicação de sobrepotenciais elevados e, como consequência directa deste facto, a enzima demonstrou uma tendência a desadsorver do eléctrodo a valores de potencial negativos. Da mesma forma, não foi possível registar espectros SERR dos eléctrodos revestidos com SAMs carregadas negativamente, contrariamente ao que foi observado nas experiências electroquímicas.

De acordo com a distribuição superficial de cargas apresentada na figura I.26, a imobilização da proteína via interacção electrostática deveria ocorrer com interfaces electrónicas positivas, visto existir uma área carregada negativamente na superfície da enzima. Efectivamente, ensaios preliminares revelam que, em determinadas condições, a *cd<sub>1</sub>NiR* adsorve eficazmente em eléctrodos revestidos com SAMs com terminação em grupos amina (cisteamina) às quais foram impostos potenciais positivos. Porém, e uma vez mais, a proteína demonstra tendência a desadsorver do eléctrodo, sendo particularmente instável a potenciais negativos. Salienta-se que esta constatação contrasta com os resultados obtidos pelas experiências electroquímicas, nas quais só foi possível obter uma resposta da proteína em superfícies modificadas com SAMs de carga negativa (MUA).

Não obstante as dificuldades encontradas, foi possível realizar uma titulação redox da *cd<sub>1</sub>NiR* e cujos resultados se apresentam na figura I.48.



**Fig. I.48:** Titulação preliminar da  $cd_1NiR$  imobilizada em eléctrodos de Ag revestidos com uma SAM de cisteamina. Os quadrados a negro representam a intensidade do  $\nu_4$  ferroso ( $1362\text{ cm}^{-1}$ ) e os círculos vermelhos representam a intensidade do  $\nu_4$  férrico ( $1372\text{ cm}^{-1}$ ), em função do potencial do eléctrodo de trabalho.

A análise destes resultados mostra a existência de duas transições redox bem definidas a, aproximadamente  $-50\text{ mV}$  e  $50\text{ mV}$  *vs* Ag/AgCl. Embora se tratem apenas de resultados preliminares, é de salientar que os valores obtidos ( $\approx 150$  e  $250\text{ mV}$  *vs* NHE) estão bastante próximos dos reportados por Besson *et al.* (1995) para os *hemos* da proteína deste mesmo organismo ( $234\text{ mV}$  para o *hemo c* e  $199\text{ mV}$  para o *hemo d<sub>1</sub>*).

As dificuldades encontradas na eficiente imobilização da  $cd_1NiR$  na superfície do eléctrodo de Ag impossibilitaram a realização de experiências de SERR com excitação a  $647\text{ nm}$ .

## I.5 – Conclusões e Perspectivas

A realização deste trabalho permitiu concluir que o procedimento de purificação adoptado no isolamento dos citocromos  $c_{552}$  e  $cd_1$  de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 é adequado, tendo sido obtidas proteínas com uma elevada razão de pureza, no seu estado nativo e com a enzima activa.

Embora a determinação da estrutura da  $cd_1$ NiR de *M. hydrocarb.* por cristalografia de raios – X não tenha sido conseguida, as evidências resultantes da análise da sequência de resíduos de aminoácidos, bem como a simulação da estrutura tridimensional da  $cd_1$ NiR indicam que esta proteína apresenta uma estrutura muito semelhante à da proteína de *Pseudomonas aeruginosa*, inclusivamente no que respeita ao modo de coordenação dos *hemos*.

Foi desenvolvido um biossensor electroquímico específico para nitritos baseado num conceito inovador. Pela primeira vez, recorreu-se ao parceiro fisiológico de uma enzima para exercer o papel de mediador electrónico, num sistema electroquímico miniaturizado, através de um processo simples, célere e eficaz de modificação de eléctrodos. Embora este sensor apresente um limite de detecção superior a outros sistemas propostos na bibliografia, deverá ser particularmente adequado a aplicações em matrizes complexas nas quais são esperados elevados teores de nitritos. Ensaio futuros em amostras reais e/ou materiais de referência certificados deverão validar esta afirmação.

A adsorção da  $cd_1$ NiR numa superfície de Au modificado com monocamadas automontadas (SAMs) permitiu alcançar uma resposta electroquímica directa da enzima. Assim, usando a técnica de voltametria cíclica, foram observados, pela primeira vez, sinais não catalíticos desta proteína. Aparentemente, a reacção de redução envolve a transferência de um electrão e de um protão, e é seguida de uma reacção química (alteração estrutural) de acordo com um mecanismo EC. Por esse motivo, o processo anódico, quando visualizado, não deverá representar a reacção inversa e a sua natureza permaneceu por esclarecer. Contudo, conhecida a elevada instabilidade da interacção electrostática entre a proteína e a superfície do eléctrodo, torna-se necessário o aprofundamento do estudo referente às condições de imobilização da enzima. Tais estudos serão úteis, não só, para a aquisição de resultados de melhor qualidade, passíveis de clarificar os processos de transferência inter e intramoleculares protagonizados pela  $cd_1$ NiR, sem recurso á utilização de mediadores electrónicos como, na eventualidade de ser conseguida actividade catalítica nestas condições, poder-se-á realizar o estudo do mecanismo da reacção catalítica por via electroquímica e assim avançar para a construção de um biossensor específico para nitritos, baseado na actividade desta enzima, que dispense a incorporação do cit- $c_{552}$ .

As experiências de espectroscopia de Ressonância Raman em solução comprovaram a integridade estrutural dos co-factores e a ocorrência das alterações conformacionais e de *spin* esperadas aquando a sua redução. A excitação selectiva dos *hemos* permitiu a identificação de modos vibracionais característicos de cada um. Os ensaios de SERR permitiram a realização de uma titulação redox dos co-factores e os resultados obtidos, embora preliminares, são concordantes com os reportados na bibliografia. Contudo, a instabilidade da ligação da proteína ao eléctrodo de trabalho, que conduziu à irreprodutibilidade dos resultados obtidos deverá ser eliminada em experiências futuras. Para esse efeito, as condições de adsorção da enzima aos eléctrodos de Ag deverão continuar a ser alvo de estudo.

## I.6 – Referências Bibliográficas

- Adman E.T., Godden J.W., Turley S., *J. Biol. Chem.*, 270: 27458-27474, **1995**.
- Allen J.W.A., Barker P.D., Daltrop O., Stevens J.M., Tomlinson E.J., Sinha N., Sambongi Y., Ferguson S.J., *Dalton Trans.*, 21:3410-3418, **2005**.
- Allen J.W.A., Cheeseman M.R., Higham C.W., Ferguson S.J., Watmough N.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279:674-677, **2000**.
- Almeida M.G., Macieira S., Goncalves L.L., Huber R., Cunha C.A., Romão M.J., Costa C., Lampreia J., Moura J.J.G., Moura I., *Eur. J. Biochem.*, 270:3904-3915, **2003**.
- Almeida M.G., Silveira C.M., Moura J.J.G., *Biosens. Bioelectron.*, 22:2485-2492, **2007**.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., *Bioinformatics*, 22:195-201, **2006**.
- Arya S.K., Solanki P.R., Datta M., Malhotra B.D., *Biosens. Bioelectron.*, 24:2810-2817, **2009**.
- Astier Y., Canters G.W., Davis J.J., Hill H.A., Verbeet M.P., Wijma H.J., *ChemPhysChem*, 6:1114-1120, **2005**.
- Ayaz A., Topcu A., Yurttagul M., *J. Food Technol.*, 5:177-179, **2007**.
- Baker S.C., Saunders N.F.W., Willis A.C., Ferguson S.J., Hajdu J., Fülöp V., *J. Mol. Biol.*, 269:440-455, **1997**.
- Barley M.H., Meyer T.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 108:5876-5885, **1986**.
- Barry R.C., Lin Y., Wang J., Liu G., Timchalk C.A., *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 19:1-18, **2009**.
- Baumann L., Baumann P., Mandel M., Allen R.D., *J. Bacteriol.*, 110:402-429, **1972**.
- Besson S., Carneiro C., Moura J.J.G., Moura I., Fauque G., *Anaerobe*, 1: 219-226, **1995**.
- Bigelow W.C., Pickett D.L., Zisman W.A., *J. Colloid Interface Sci.*, 1:513-538, **1946**.
- Blair E., Sulc F., Farmer P.J., In Zagal J.H., Bedioui F., Dodelet J.P. Eds., *N4-macrocyclic metal complexes*, 1st ed., Springer: New York, USA, pp. 149-181, **2006**.
- Brittain T., Blackmore R., Greenwood C., Thomson A.J., *Eur. J. Biochem.*, 209:793-802, **1992**.
- Bryan N.S., Fernandez B.O., Bauer S.M., Garcia-Saura M.F., Milsom A.B., Rassaf T., Maloney R.E., Bharti A., Rodriguez J., Feelisch M., *Nat. Chem. Biol.*, 1:290-297, **2005**.
- Bryan N.S., Grisham M.B., *Free Radic. Biol. Med.*, 43:645-657, **2007**.
- Brown K., Nurizzo D., Cambillau C., *J. Mol. Biol.*, 289:1017-1028, **1999**.
- Brown K., Roig-Zamboni V., Cutruzzola F., Arese M., Sun W., Brunori M., Cambillau C., Tegoni M., *J. Mol. Biol.*, 312:541-554, **2001**.
- Camargo J.A., Alonso Á., *Environ. Int.*, 32:831-849, **2006**.

- Centola F., Rinaldo S., Brunori M., Cutruzzolà F., *FEBS J.*, 273:4495-4503, **2006**.
- Chaubey A., Malhotra B.D., *Biosens. Bioelectron.*, 17:441-456, **2002**.
- Chen H., Mousty C., Chen L., Cosnier S., *Mat. Sci. Eng. C*, 28:726-730, **2008**.
- Chen H., Mousty C., Cosnier S., Silveira C., Moura J.J.G., Almeida M.G., *Electrochem. Commun.*, 9:2241-2246, **2007**.
- Chen Q., Ai S., Zhu X., Yin H., Ma Q., Qiu Y., *Biosens. Bioelectron.*, 24:2991-2996, **2009**.
- Cooper C.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1411:290-309, **1999**.
- Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter J.C., Glavina del Rio T., Hammon N., Israni S., Dalin E., Tice H., Pitluck S., Kiss H., Brettin T., Bruce D., Han C., Tapia R., Gilna P., Schmutz J., Larimer F., Land M., Hauser L., Kyrpides N., Kim E., Edwards K., Richardson P., *EMBL/GenBank/DDBJ databases*, **2006**.
- Correia C., Besson S., Brondino C.D., González P.J., Fauque G., Lampreia J., Moura I., Moura J.J.G., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13:1321-1333, **2008**.
- Correia M., Barroso Â., Barroso M.F., Soares D., Oliveira M.B.P.P., Delerue-Matos C., *Food Chem.*, 120:960-966, **2010**.
- Costa C., Macedo A., Moura I., Moura J.J.G., Le Gall J., Berlier Y., Liu M.Y., Payne W.J., *FEBS Lett.*, 276:67-70, **1990**.
- Cotton T.M., Timkovich R., Cork M.S., *FEBS Lett.*, 133:39-44, **1981**.
- Cunha C.A., Macieira S., Dias J.M., Almeida G., Gonçalves L.L., Costa C., Lampreia J., Huber R., Moura J.J.G., Moura I., Romão M.J., *J. Biol. Chem.*, 278:17455-17465, **2003**.
- Cutruzzolà F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1411:231-249, **1999**.
- Cutruzzolà F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1411:231-249, **1999**.
- Cutruzzolà F., Brown K., Wilson E.K., Bellelli A., Arese M., Tegoni M., Cambillau C., Brunori M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:2232-2237, **2001**.
- Cutruzzolà F., Rinaldo S., Centola F., Brunori M., *IUBMB Life*, 55:617-621, **2003**.
- Das T.K., Wilson E.K., Cutruzzolà F., Brunori M., Rousseau D.L., *Biochemistry*, 40:10774-10781, **2001**.
- Dejam A., Hunter C.J., Pelletier M.M., Hsu L.L., Machado R.F., Shiva S., Power G.G., Kelm M., Gladwin M.T., Schechter A.N., *Blood*, 106:734-739, **2005**.
- Dejam A., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T., *Blood Cells Mol. Dis.*, 32:423-429, **2004**.
- Dell'aqua S., Pauleta S.R., Monzani E., Pereira A.S., Casella L., Moura J.J., Moura I., *Biochemistry*, 47:10852-10862, **2008**.
- Ding Y., Wang Y., Li B., Lei Y., *Biosens. Bioelectron.*, 25:2009-2015, **2010**.
- Dutt J., Davis J., *J. Environ. Monit.*, 4:465-471, **2002**.

- Dutton R., *Met. Finish.*, 102:12-15, **2004**.
- Einsle O., Kroneck P.M., *Biol. Chem.*, 385:875-883, **2004**.
- Einsle O., Messerschmidt A., Stach P., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Huber R., Kroneck P.M., *Nature*, 400:476-480, **1999**.
- Eiserich J.P., Patel R.P., O'Donnell V.B., *Mol. Aspects. Med.*, 19:221-357, **1998**.
- Ellis G., Adatia I., Yazdanpanah M., Makela S.K., *Clin. Biochem.*, 31:195-220, **1998**.
- Farver O., Brunori M., Cutruzzolà F., Rinaldo S., Wherland S., Pecht I., *Biophys. J.*, 96:2849-2856, **2009**.
- Farver O., Kroneck P.M.H., Zumft W.G., Pecht I., *Biophys. Chem.*, 98:27-34, **2002**.
- Farver O., Kroneck P.M.H., Zumft W.G., Pecht I., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:7622-7625, **2003**.
- Fauque G., Moura J.J.G., Besson S., Saraiva L.M., Moura I., *Océanis*, 18:211-216, **1992**.
- Ferretti S., Lee S., MacCraith B.D., Oliva A.G., Richardson D.J., Russell D.A., Sapsforda K.E., Vidalc M., *Analyst*, 125:1993-1999, **2000**.
- Fransconi M., Mazzei F., Ferri T., *Anal. Bioanal. Chem.*, 398:1545-1564, **2010**.
- Fülöp V., Moir J.W.B., Ferguson S.J., Hajdu J., *Cell*, 81:369-377, **1995**.
- Galloway J.N., In Heinrich D.H. & Karl K.T. Eds., *Treatise on Geochemistry*, Pergamon, Oxford, USA, pp. 557-583, **2003**.
- Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.-C., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 42:568-576, **1992**.
- Geng R., Zhao G., Liu M., Li M., *Biomaterials*, 29:2794-2801, **2008**.
- Giardina B., Messana I., Scatena R., Castagnola M., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30:165-196, **1995**.
- Goodhew C.F., Brown K.R., Pettigrew G.W., *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics*, 852:288-294, **1986**.
- Gordon, E.H.J.; Sjögren, T.; Löfqvist, M.; Richter, C.D.; Allen, J.W.A.; Higham, C.W.; Hajdu, J.; Fülöp, V.; Ferguson, S.J., *J. Biol. Chem.*, 278:11773-11781, **2003**.
- Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I., *Anal. Chim. Acta*, 400:91-108, **1999**.
- Guex N., Peitsch M. C., *Electrophoresis*, 18: 2714-2723, **1997**.
- Helmke S.M., Duncan M.W., *J. Chromatogr. B*, 851:83-92, **2007**.
- Hirasawa M., Tripathy J.N., Sommer F., Somasundaram R., Chung J.S., Nestander M., Kruthiventi M., Zabet-Moghaddam M., Johnson M.K., Merchant S.S., Allen J.P., Knaff D.B., *Photosynth. Res.*, 103:67-77, **2010**.
- Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S., *Am. J. Clin. Nutr.*, 90:1-10, **2009**.

- Huu N.B., Denner E.B., Ha D.T., Wanner G., Stan-Lotter H., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49:367-375, **1999**.
- Ishimori K., In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- Jafferji A., Allen J.W., Ferguson S.J., Fulop V., *J. Biol. Chem.*, 275:25089-25094, **2000**.
- Jjögren T., Hajdu J., *J. Biol. Chem.*, 276:29450-29455, **2001**.
- Jjögren T., Svensson-Ek M., Hajdu J., Brzezinski P., *Biochemistry*, 39:10967-10974, **2000**.
- Jorge S.R.S., Mestrado Integrado em Engenharia Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Dissertação em Preparação, **2011**.
- Kelley L.A., Sternberg M.J.E., *Nature Protocols*, 4:363-371, **2009**.
- Kharitonov V.G., Sharma V.S., Magde D., Koeshing D., *Biochemistry*, 36:6814-6818, **1997**.
- Kiang C.H., Kuan S.S., Guilbault G.G., *Anal. Chim. Acta*, 80:209-214, **1975**.
- Kissinger P.T., *Biosens. Bioelectron.*, 20:2512-2516, **2005**.
- Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Namba K., Simidu U., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:8-19, **1993**.
- Kobayashi K., Koppenhöfer A., Ferguson S.J., Watmough N.J., Tagawa S., *Biochemistry*, 40:8542-8547, **2001**.
- Koppenhöfer A., Little R.H., Lowe D.J., Ferguson S.J., Watmough N.J., *Biochemistry*, 39:4028-4036, **2000**.
- Kukimoto M., Nishiyama M., Murphy M.E., Turley S., Adman E.T., Horinouchi S., Beppu T., *Biochemistry*, 33:5246-5252, **1994**.
- Kuznetsova S., Knaff D.B., Hirasawa M., Lagoutte B., Setif P., *Biochemistry*, 43:510-517, **2004**.
- Larsson S.C., Orsini N., Wolk A., *J. Natl. Cancer Inst.*, 98:1078-1087, **2006**.
- Léger C., Bertrand P., *Chem. Rev.*, 108:2379-2438, **2008**.
- Lijinsky W., *Mutat. Res.*, 443:129-138, **1999**.
- Liu L., Zhao F., Liu L., Li J., Zeng B., *Colloids Surf. B*, 68:93-97, **2009**.
- Liu S., Ju H., *Analyst*, 128:1420-1424, **2003**.
- Lojou E., Cutruzzolà F., Tegoni M., Bianco P., *Electrochim. Acta*, 48:1055-1064, **2003**.
- Lopes H., Besson S., Moura I., Moura J.J.G., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6:55-62, **2001**.
- Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M., *Chem. Rev.*, 105:1103-1169, **2005**.



- Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A., Benjamin N., Bryan N.S., Butler A., Cabrales P., Fago A., Feelisch M., Ford P.C., Freeman B.A., Frenneaux M., Friedman J., Kelm M., Kevil C.G., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Lancaster J.R., Lefer D.J., McColl K., McCurry K., Patel R.P., Petersson J., Rassaf T., Reutov V.P., Richter-Addo G.B., Schechter A., Shiva S., Tsuchiya K., van Faassen E.E., Webb A.J., Zuckerbraun B.S., Zweier J.L., Weitzberg E., *Nat. Chem. Biol.*, 5:865-869, **2009**.
- Márquez M.C., Ventosa A., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55:1349-1351, **2005**.
- Matsuura Y., Takano T., Dickerson R.E., *J. Mol. Biol.*, 156:389-409, **1982**.
- Metters J.P., Kadara R.O., Banks C.E., *Analyst*, 136:1067-1076, **2011**.
- Moorcroft M.J., Davis J., Compton R.G., *Talanta*, 54:785-803, **2001**.
- Moura I., Moura J.J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5:168-175, **2001**.
- Moura, I.; Pauleta, S.R.; Moura, J.J.G., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13:1185-1195, **2008**.
- Muhoberac B.B., Wharton D.C., *J. Biol. Chem.*, 258:3019-3027, **1983**.
- Murphy M.E., Turley S., Adman E.T., *J. Biol. Chem.*, 272:28455-28460, **1997**.
- Nurizzo D., Cutruzzolà F., Arese M., Bourgeois D., Brunori M., Cambillau C., Tegoni M., *Biochemistry*, 37:13987-13996, **1998**.
- Najmudin S., Pauleta S.R., Moura I., Romão M.J., *Acta Crystallogr. Sect. F*, 66:627-635, **2010**.
- Nurizzo D., Cutruzzolà F., Arese M., Bourgeois D., Brunori M., Cambillau C., Tegoni M., *J. Biol. Chem.*, 274:14997-15004, **1999**.
- Nurizzo D., Silvestrini M., Mathieu M., Cutruzzolà F., Bourgeois D., Fülöp V., Hajdu J., Brunori M., Tegoni M., Cambillau C., *Structure*, 5:1157-1171, **1997**.
- Nussler A.K., Bruckner U.B., Vogt J., Radermacher P., *Methods Enzymol.*, 359:75-83, **2002**.
- Ochoteco E., Jubete E., Pomposo J.A., Grande H. *et al*, Patent Application Number E200930539, **2009**.
- Oganesyan V.S., Cheesman M.R., Thomson A. J., *Inorg. Chem.*, 46:10950-10952, **2007**.
- Onyesom I., Okoh P.N., *Br. J. Nutr.*, 96:902-905, **2006**.
- Pelletier M.M., Kleinbongard P., Ringwood L., Hito R., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T., Dejam A., *Free Radic. Biol. Med.*, 41:541-548, **2006**.
- Protein Electrophoresis – technical manual*, 80-6013-88, Amersham Biosciences, USA, **1999**.
- Quan D., Min D.G., Cha G.S., Nam H., *Bioelectrochemistry*, 69:267-275, **2006**.
- Radoul M., Bykov D., Rinaldo S., Cutruzzolà F., Neese F., Goldfarb D., *J. Am. Chem. Soc.*, 133:3043-3055, **2011**.
- Richardson D.J., Watmough N.J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:207-219, **1999**.

Richter C.D., Allen J.W.A., Higham C.W., Koppenhöfer A., Zajicek R.S., Watmough N.J., Ferguson S.J., *J. Biol. Chem.*, 277:3093-3100, **2002**.

Rinaldo S., Brunori M., Cutruzzolà F., *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 363:662-666, **2007A**.

Rinaldo S., Arcovito A., Brunori M., Cutruzzolà F., *J. Biol. Chem.*, 282:14761-14767, **2007B**.

Rodrigues M.L., Oliveira T.F., Pereira I.A.C., Archer M., *Embo J.*, 25:5951-5960, **2006**.

Rosa C.C., Cruz H.J., Vidal M., Oliva A.G., *Biosens. Bioelectron.*, 17:45-52, **2002**.

Rusling J.F., Wang B., Yun S.,; In Philip Bartlett Ed., *Bioelectrochemistry – Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, pp. 39-86, John Wiley & Sons, Ltd., **2008**.

Sam K.A., Fairhurst S.A., Thorneley R.N.F., Allen J.W.A., Ferguson S.J., *J. Biol. Chem.*, 283:12555-12563, **2008**.

Saraiva L.M., Fauque G., Besson S., Moura I., *Eur. J. Biochem.*, 224:1011-1017, **1994**.

Sasaki S., Karube I., Hirota N., Arikawa Y., Nishiyama M., Kukimoto M., Horinouchi S., Beppu T., *Biosens. Bioelectron.*, 13:1-5, **1998**.

Saunders N.F.W., Ferguson S.J., Baker S.C., *Microbiology*, 146:509-516, **2000**.

Scharf M., Moreno C., Costa C., Van Dijk C., Payne W.J., LeGall J., Moura I., Moura J.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209:1018-1025, **1995**.

Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J., *Nucl. Acids. Res.*, 33:W363-367, **2005A**.

Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J., *Proteins*, 60:224-231, **2005B**.

Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C., *Nucleic Acids Res.*, 31: 3381-3385, **2003**.

Silva S.D., Cosnier S., Almeida M.G., Moura J.J.G., *Electrochem. Commun.*, 6:404-408, **2004**.

Silveira C.M., Besson S., Moura I., Moura J.J.G., Almeida M.G., *Bioinorg. Chem. Appl.*, Article ID 634597, 8 pages, **2010A**.

Silveira C.M., Gomes S.P., Araujo A.N., Montenegro M.C., Todorovic S., Viana A.S., Silva R.J., Moura J.J.G., Almeida M.G., *Biosens. Bioelectron.*, 25:2026-2032, **2010B**.

Silveira C.M., Baur J., Holzinger M., Moura J.J.G., Cosnier S., Almeida M.G., *Electroanalysis*, 22:2973-2978, **2010C**.

Silvestrini M.C., Galeotti C.L., Gervais M., Schinina E., Barra D., Bossa F., Brunori M., *FEBS Lett.*, 254:33-38, **1989**.

Silvestrini M.C., Tordi M.G., Musci G., Brunori M., *J. Biol. Chem.*, 265:11783-11787, **1990**.

Siu D.C., Henshall A., *J. Chromatogr. A*, 804:157-160, **1998**.

Skovgaard N., *Food Addit. Contam.*, 9:391-397, **1992**.

Smolders A., Lucassen E., Bobbink R., Roelofs J., Lamers L., *Biogeochemistry*, 98:1-7, **2010**.

- Sproer C., Lang E., Hobeck P., Burghardt J., Stackebrandt E., Tindall B.J., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48:1445-1448, **1998**.
- Strehlitz B., Grundig B., Schumacher W., Kroneck P.M.H., Vorlop K., Kotte H., *Anal. Chem.*, 68:807-816, **1996**.
- Strehlitz B., Grundig B., Vorlop K., Bartholmes P., Kotte H., Stottmeister U., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349:676-678, **1994**.
- Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H., *Sensors*, 3:276-284, **2003**.
- Sun W., Arese M., Brunori M., Nurizzo D., Brown K., Cambillau C., Tegoni M., Cutruzzolà F., *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 291:1-7, **2002**.
- Sun W., Li X., Wang Y., Li X., Zhao C., Jiao K., *Bioelectrochemistry*, 75:170-175, **2009**.
- Swamy U., Wang M., Tripathy J.N., Kim S.-K., Hirasawa M., Knaff D.B., Allen J.P., *Biochemistry*, 44:16054-16063, **2005**.
- Tepper A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 132:6550-6557, **2010**.
- Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Pure Appl. Chem.*, 71:2333-2348, **1999**.
- Timkovich R., Robinson M.K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88:649-655, **1979**.
- Tsikas D., *Free Radical Res.*, 39:797-815, **2005**.
- Tsikas D., *J. Chromatogr. B*, 851:51-70, **2007**.
- Tudorache M., Bala C., *Anal. Bioanal. Chem.*, 388:565-578, **2007**.
- van Wonderen J.H., Knight C., Oganessian V.S., George S.J., Zumft W.G., *J. Biol. Chem.*, 282:28207-28215, **2007**.
- Vericat C., Vela M.E., Salvarezza R.C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7:3258-3268, **2005**.
- Vicente M.G.H., Smith, K.M., In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- Victorin K., *Mutat. Res.-Rev. Genet.*, 317:43-55, **1994**.
- Walsh T.A., Johnson M.K., Greenwood C., Barber D., Springall J.P., Thomson A.J., *Biochem. J.*, 177:29-39, **1979**.
- Werland S., Farver O., Pecht I., *Chem. Phys. Chem.*, 6:805-812, **2005**.
- Williams P.A., Fülöp V., Garman E. F., Saunders N.F.W., Ferguson S.J., Hajdu J., *Nature*, 389:406-412, **1997**.
- Wu Q., Storrier G.D., Pariente F., Wang Y., Shapleigh J.P., Abruna H.D., *Anal. Chem.*, 69:4856-4863, **1997**.
- Wu W., Chang C.K., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:3149-3150, **1987**.
- Wu Y., Shen Q., Hu S., *Anal. Chim. Acta*, 558:179-186, **2006**.

Yan Y., Yang J., Dou Y., Ping S., Chen M., Yao Z., Li H., Lu W., Zhang W., Peng J., Liu W., He S., Geng L., Zhang X., Yang F., Li D., Lin Z., Wang Y., Elmerich C., Lin M., Jin Q., *EMBL/GenBank/DBJ databases*, **2006**.

Younathan J.N., Wood K.S., Meyer T.J., *Inorg. Chem.*, 31:3280-3285, **1992**.

Zajicek R.S., Cartron M.L., Ferguson S.J., *Biochemistry*, 45:11208-11216, **2006**.

Zhang Z., Xia S., Leonard D., Jaffrezic-Renault N., Zhang J., Bessueille F., Goepfert Y., Wang X., Chen L., Zhu Z., Zhao J., Almeida M.G., Silveira C.M., *Biosens. Bioelectron.*, 24:1574-1579, **2009**.

Zhao X., Mai Z., Kang X., Dai Z., Zou X., *Electrochim. Acta*, 53:4732-4739, **2008**.

Zhao Y., Zhang W., Chen H., Luo Q., Li S.F.Y., *Sens. Actuators B*, 87:168-172, **2002**.

Zhu W.-L., Zhou Y., Zhang J.-R., *Talanta*, 80:224-230, **2009**.

Zumft W.G., Döhler K., Körner H., Löchelt S., Viebrock A., Frunzke K., *Arch. Microbiol.*, 149:492-498, **1988**.

## **I.7 – Bases de Dados e Programas Informáticos de Livre Utilização**

<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/>

<http://swissmodel.expasy.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<http://www.expasy.ch/>

<http://www.uniprot.org/>

<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>

<http://www.genome.jp/kegg/>

## **PARTE II:**

**Desulfovirdina de *Desulfovibrio*  
*desulfuricans* ATCC 27774. Isolamento,  
Caracterização e Desenvolvimento de um  
Biossensor Electroquímico para  
Determinação de Sulfito.**



## II.1 – Objectivos

Este trabalho teve por principal objectivo a construção de um biossensor electroquímico específico para a determinação de sulfito, baseados na redutase do sulfito dissimilativa dessulfovirdina (Dsv), isolada a partir da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, como elemento de reconhecimento biológico.

Numa primeira etapa, pretendeu-se proceder à caracterização bioquímica e estrutural da enzima através de métodos bioquímicos, espectroscópicos e bioinformáticos. Seguidamente, procurou-se desenvolver um biossensor electroquímico baseado numa resposta electroquímica mediada, com recurso a mediadores artificiais.

## II.2 – Introdução Geral

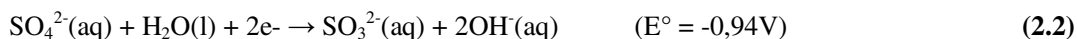
### II.2.1 – Sulfitos

#### II.2.1.1 – Breve Caracterização Química das Espécies de Enxofre

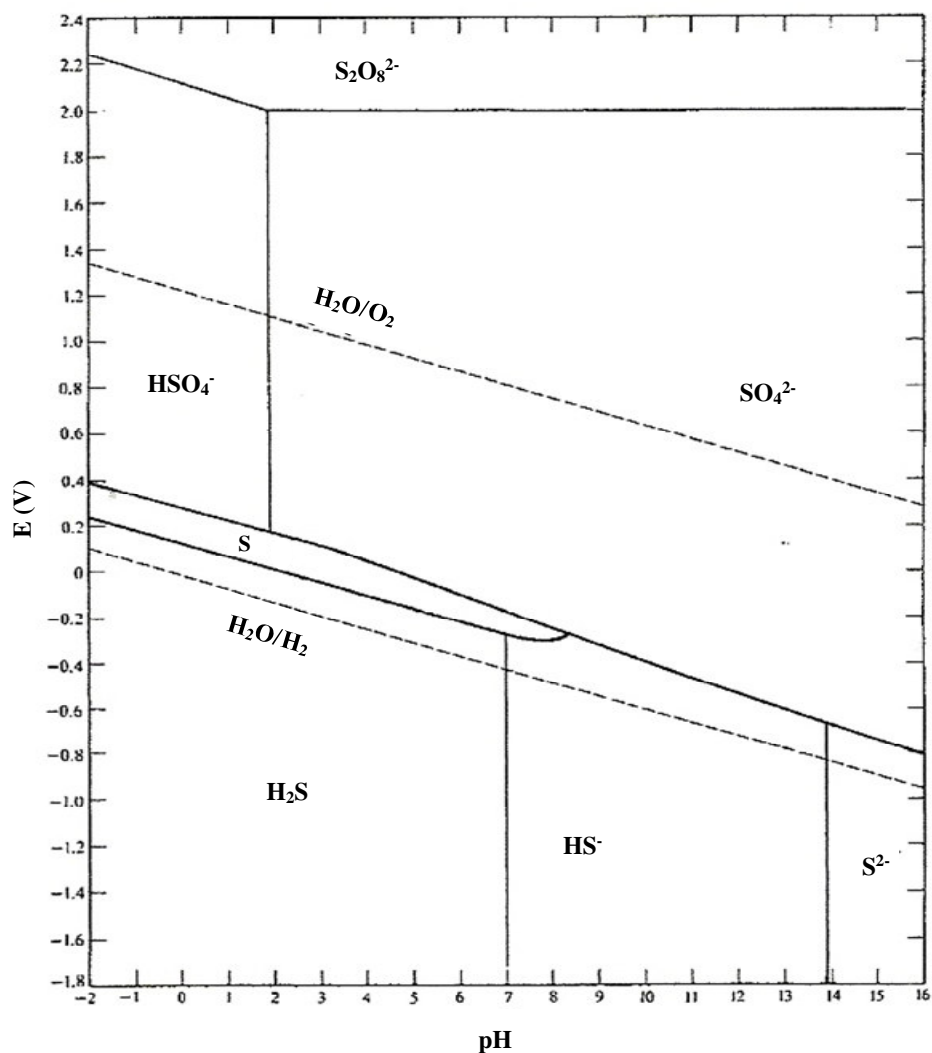
A capacidade do enxofre em existir de forma estável em diversos estados de oxidação (sendo os mais comuns -2, 0, +2, +4 e +6) contribui para a existência de diversas espécies, aniónicas e neutras, que exibem diferentes propriedades químicas.

O diagrama de Pourbaix apresentado na figura II.1 evidencia a forte dependência das propriedades redox destas espécies relativamente ao pH do meio.

No caso do dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) e do ião sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) o efeito do pH é particularmente importante. O  $\text{SO}_2$  é facilmente reduzido em meio ácido, sendo um bom agente oxidante, ao passo que o  $\text{SO}_3^{2-}$  é principalmente um agente redutor em meio básico.



Em meio básico o  $\text{HSO}_3^-$  existe num equilíbrio entre as formas  $\text{H} - \text{SO}_3^-$  e  $\text{H} - \text{OSO}_2^-$  e em soluções ácidas a principal espécie presente é o  $\text{SO}_2$ , e não o  $\text{H}_2\text{SO}_3$  (Shriver & Atkins, 1999).

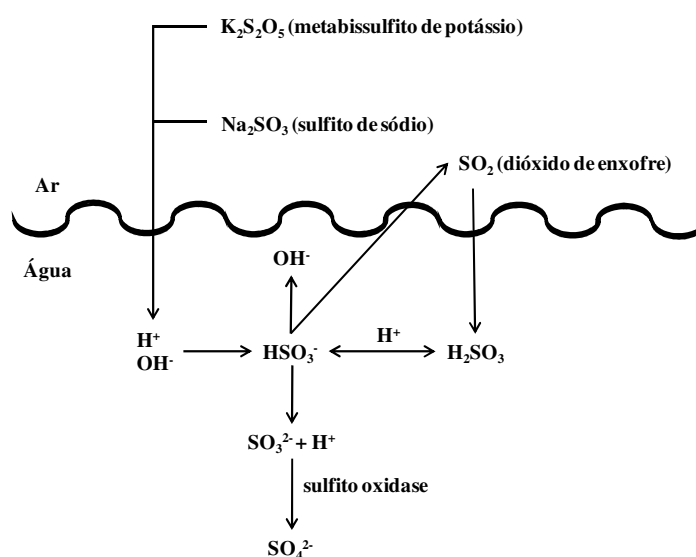


**Fig. II.1:** Diagrama de Pourbaix (simplificado) para os equilíbrios estáveis do sistema enxofre - água a 25°C (Pourbaix, 1974).



### II.2.1.2 – Aplicações Industriais

O termo genérico **sulfitos** engloba o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) e diversas formas de oxoaniões de enxofre que, de acordo com as condições de utilização, apresentam a capacidade de libertar  $\text{SO}_2$ . Nesta gama de compostos encontram-se os bissulfitos de sódio e potássio ( $\text{NaHSO}_3$  e  $\text{KHSO}_3$ ), os metabissulfito de sódio e potássio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  e  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) e o sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). No diagrama da figura II.2 encontra-se a representação esquemática da interconversão de tais agentes a qual, tal como foi referido anteriormente, depende fortemente do pH do meio.



**Fig. II.2:** Química dos sulfitos. A conversão dos sais de enxofre em meio aquoso origina a produção *in situ* de dióxido de enxofre (Vally *et al.*, 2009).

Para além das espécies que constituem o “enxofre livre”, formadas em solução e representadas na figura II.2, formam-se também compostos derivados resultantes de reacções entre o  $\text{SO}_2$  e diversas macromoléculas tais como açúcares, proteínas e lípidos. Tais reacções dependem predominantemente das condições de pH e temperatura e são responsáveis pela fracção denominada de “enxofre combinado” (Curvelo-Garcia, 1988; Vally *et al.*, 2009). A utilização destes compostos como aditivos alimentares deriva das suas reconhecidas propriedades de branqueamento e actividades antimicrobiana e antioxidante (Taylor *et al.*, 1986). Esta família de compostos é particularmente eficaz no controlo do escurecimento (do inglês *browning*) enzimático, por inibição da actividade da polifenol oxidase (Sayavedra-Soto & Montgomery, 1986), e não enzimático, por inibição da reacção de Maillard (McWeeny *et al.*, 1974), tanto nos alimentos frescos (frutas e vegetais), quanto nos processados.

O recurso ao dióxido de enxofre enquanto ingrediente no processamento de alimentos e medicamentos encontra-se relatado nas culturas clássicas (Grécia, Roma, Egipto) que reportam a utilização do SO<sub>2</sub> na fumigação de casas e no saneamento dos recipientes para armazenamento de vinho e, já no século XVII, encontra-se descrita a aplicação deste gás como conservante de cidra. O recurso a sulfitos surgiu somente no início do séc. XX. Utilizados inicialmente apenas na produção de vinhos e cervejas, rapidamente o seu uso se expandiu à produção alimentar como consequência da sua alegada inocuidade e elevada eficiência funcional. Como prova disso encontra-se o aumento anual, calculado entre os 30% e os 70%, na utilização deste tipo de compostos na indústria alimentar verificado nos EUA entre as décadas de 60 e 70 do séc. passado (Taylor *et al.*, 1986).

Na tabela II.1 encontram-se listadas as principais aplicações industriais de sulfitos bem como os principais produtos alimentares, cosméticos e medicamentos que contêm aditivos deste tipo.

**Tabela II.1:** Alguns exemplos de aplicações industriais de agentes sulfitantes e produtos alimentares, medicamentos e cosméticos que contêm sulfitos (Vally *et al.*, 2009).

Indústria	Aplicação e Produtos
Alimentar	Conservantes, estabilizantes e/ou esterilizadores em: refrigerantes e sumos de fruta, cidra, vinho e cerveja, frutos secos, bolos e bolachas, doces e compotas, salsichas e carnes fumadas.
Farmacêutica e Cosmética	Antioxidantes e/ou estabilizantes em: anti-fungicos e corticoesteroides, adrenalina, dopamina, anestésicos locais e complexos de vitamina B, colorantes de cabelo, auto-bronzeadores, cremes anti-idade, lacas e perfumes.
Têxtil	Descolorantes, agentes solubilizantes de taninos, captadores de enxofre e cloro, redutores de licores de crómio.
Tratamento de Efluentes	Redução de sais de crómio, neutralizante e desinfetante.

Contudo, é na indústria vitivinícola que a utilização deste tipo de agentes possui o seu expoente máximo. A importância do emprego do SO<sub>2</sub> em Enologia é tal que, apesar das diversas recomendações de instituições internacionais (como a FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, a OMS – Organização Mundial de Saúde e o OIV – *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*) visando a sua redução ou mesmo a substituição deste aditivo por outros, continua hoje a ser largamente utilizado na prática enológica.

Segundo a generalidade da bibliografia sobre o assunto, nenhum outro aditivo apresenta um tão largo espectro de propriedades benéficas na vinificação e na conservação dos vinhos; é um poderoso antioxidante, um inibidor enzimático, combina-se com os produtos de oxidação, estabiliza os pigmentos antocianicos, evita o aparecimento de determinadas turvações e assegura a inibição de uma vasta gama de microrganismos. Contudo, é também opinião generalizada a necessidade de se procurar tecnologias capazes de permitir a utilização em doses cada vez mais reduzidas, racionalizando o seu emprego (Curvelo-Garcia, 1988; Boulton *et al.*, 1996). Porém, os métodos alternativos à utilização deste tipo de aditivos, quer na indústria alimentar que na produção vitivinícola, apresentam normalmente uma gama de benefícios mais estreita, são menos eficazes e, de um modo geral, mais dispendiosos (Iyengar & McEvily, 1992; Lambrecht, 1995; Friedman, 1996).

#### **II.2.1.3 – Efeitos na Saúde**

No início dos anos 70 surgiram os primeiros relatos de reacções adversas relacionadas com a exposição excessiva a sulfitos. Encontra-se reportado que a exposição tópica, oral ou parenteral a sulfitos poderá induzir toda uma gama de efeitos clínicos adversos em indivíduos sensíveis a este tipo de compostos. A sensibilidade aos sulfitos foi apontada como a causa de diversos casos de reacções alérgicas (dérmicas e respiratórias) manifestadas maioritariamente sob a forma de dermatites e episódios de crise em pacientes asmáticos. Esta situação poderá ser tanto mais problemática quanto é sabido que casos mais graves de reacções adversas, nomeadamente choque anafiláctico, são tratados com injeções de adrenalina que possuem sulfitos na sua composição, assim como a maioria dos medicamentos utilizados no controlo da asma crónica, podendo por isso ser parcialmente responsáveis pelo prolongamento dos sintomas que deveriam tratar (Vally *et al.*, 2009).

Com a existência de uma franja de população particularmente vulnerável à ocorrência de sulfitos em produtos alimentares, os legisladores (tanto nos EUA quanto na Europa) foram forçados a abandonar a classificação de “genericamente seguros” para esta classe de compostos, existindo hoje em dia toda uma série de normas que atribuem limites máximos à quantidade de sulfitos, sendo que esses limites se encontram fortemente dependentes do tipo de produtos a que se aplicam.

#### II.2.1.4 – Normas de Aplicação

Nos EUA, as normas aplicadas à utilização de sulfitos encontram-se distribuídas, de acordo com o tipo de aplicação específica, pela FDA (*Food and Drug Administration*), USDA (*United States Department of Agriculture*), BATF (*Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms*) e EPA (*Environmental Protection Agency*). Actualmente, a FDA proíbe a utilização de sulfitos em carnes, alimentos reconhecidos como fontes primordiais de vitamina B-1 e frutas ou vegetais destinados a ser consumidos em cru. Quanto aos alimentos processados tornou-se obrigatória a declaração de presença de sulfitos no rótulo desde que se encontrem numa quantidade detectável, definida como 10 ppm (FDA-21CFR).

Na Europa são essencialmente dois os documentos que legislam a utilização deste tipo de aditivos. A Directiva Comunitária n.º 95/2/CE relativa aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes, e o Regulamento CE n.º 606/2009 que estabelece regras de execução no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.

Na Directiva Comunitária, o dióxido de enxofre e sulfitos (aditivos a que foram atribuídos os códigos entre E220 e E228) são classificados como “Conservantes e Antioxidantes Autorizados sob Determinadas Condições”, encontrando-se exaustivamente listados os alimentos nos quais é permitido o seu emprego, bem como os limites máximos permitidos para cada tipo de produto (10 a 2000 ppm). Os teores máximos são expressos em equivalentes de SO<sub>2</sub>, em mg/kg ou mg/l, e referem-se às quantidades totais, de todas as origens (enxofre livre e conjugado). Um teor de SO<sub>2</sub> total inferior a 10 ppm é considerado inexistente (à semelhança das regras impostas pela FDA). Salienta-se que esta directiva foi já alterada por diversas vezes (96/85/CE; 98/72/CE; 2001/5/CE; 2003/52/CE e 2003/114/CE) e, sempre que ocorreram alterações nos níveis permitidos de sulfitos foi no sentido da sua redução. Com efeito, os limites permitidos estão condicionados pelos limites de quantificação dos métodos de análise existentes e à medida que aumenta a capacidade técnica na quantificação deste tipo de compostos, os limites legais impostos vão sendo cada vez menores.

A aplicação generalizada de sulfitos na indústria vitivinícola e a diversidade de produtos produzidos neste sector faz com que seja alvo de regulamentação própria e específica. O Regulamento CE n.º 606/2009 é o mais recente documento normativo nesta área e, uma vez mais, as alterações propostas visam a redução das quantidades máximas permitidas de sulfitos face à legislação anteriormente aplicável (150 a 450 ppm consoante o tipo de vinho).

### II.2.1.5 – Métodos de Quantificação

O método de referência para a quantificação de dióxido de enxofre em vinhos (OIV, 2006) é uma optimização de método de Monier – Williams (1927) e consiste na extracção gasosa do  $\text{SO}_2$  por passagem de uma corrente de ar ou  $\text{N}_2$  através da matriz. Em seguida o dióxido de enxofre é arrastado através de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na qual é oxidado e fixo sob a forma de ácido sulfúrico. O  $\text{H}_2\text{SO}_4$  assim formado é então titulado com uma solução padronizada de hidróxido de sódio. Este método é, segundo a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) também um dos métodos de referência para aplicação em matrizes alimentares (*Official Method* n. 990.28, OMA, 2000; AOAC International, 2010). A titulação idométrica (directa ou inversa) é também um método bastante popular, sendo reconhecida pela OIV como método alternativo (rápido) e no qual se baseiam os métodos de referência empregues em diversos países. Este procedimento porém está sujeito a um elevado nível de interferência, dependendo fortemente das condições experimentais em que os ensaios são realizados (Joslyn, 1955). Na tabela II.2 encontram-se descritos resumidamente os principais métodos de determinação de sulfitos propostos na bibliografia mais recente.

Não obstante a diversidade dos métodos sumariamente apresentados na tabela II.2, a complexidade das matrizes conduz à necessidade de, na maioria dos casos, a análise ser precedida de passos de extracção e/ou derivatização dos sulfitos. Em alternativa, os efeitos de matriz são minimizados pela elevada diluição das amostras. Esta abordagem porém levanta o problema da possível ocorrência de perdas significativas de analito no decurso da preparação e análise das amostras, sobretudo no que respeita ao  $\text{SO}_2$  livre. Na grande maioria dos métodos referenciados, a análise de interferentes não foi devidamente realizada, limitando-se os autores a procurar o efeito de interferentes conhecidos para aquele método específico ou, mais comum, comparar os resultados obtidos nos seus sistemas com resultados provenientes de métodos de referência, geralmente titulações iodométricas que, como já foi referido, são alvo de toda uma série de interferências. Nos últimos anos verificou-se a primazia dos métodos electroquímicos na quantificação de sulfitos e, embora as modificações nos eléctrodos de trabalho propostas pelos diferentes autores permitam diminuir o sobrepotencial da reacção, a necessidade de operar a potenciais elevados ( $\geq 0,6 \text{ V vs NHE}$ ) aumenta o risco de ocorrência de reacções inespecíficas.

A aplicação da tecnologia de biossensores à análise de sulfitos em matrizes complexas, como é o caso dos produtos alimentares, com especial destaque para os vinhos, é uma forma atractiva de ultrapassar as interferências causadas pelos efeitos de matriz, devido à elevada selectividade que caracteriza este tipo de dispositivos. Na tabela II.3 apresentam-se as principais características e parâmetros analíticos dos biossensores propostos na literatura para a determinação de sulfitos.

**Tabela II.2:** Métodos para determinação de sulfitos. GL – gama de linearidade; LD – limite de detecção; n.d.– não determinado; n.i.– não identificado.

Matriz	Método	GL/ppm	LD/ppm	Interferentes	Referência
Vinhos, xaropes e concentrados de fruta	FIA com detecção amperométrica	0,25 – 15	0,05	cores intensas	Cardwell & Christophersen, 2000
vinhos	FIA com detecção Coulométrica	1 – 10	0,001	n.d.	Chen <i>et al.</i> , 2000
vinhos	Separação por difusão gasosa/ cromatografia iónica	1 – 100	n.d.	n.d.	Fäldt <i>et al.</i> , 2001
vinhos	Electroforese capilar com derivatização <i>in capilar</i>	0,64 – 51,2	0,1	n.i.	Jankovskiene <i>et al.</i> , 2001
vinhos	Titulação Coulométrica	25,6 – 76,8	0,64	cores intensas	Lowinsohn & Bertotti, 2001
vinhos	SIA com detecção espectrofotométrica	2 – 40 25 – 250	0,1 0,6	CO <sub>2</sub>	Segundo & Rangel, 2001
-----	FIA com detecção amperométrica	0 – 9	0,15	n.i.	Carballo <i>et al.</i> , 2003
conservas de vegetais	HPCL com detecção por UV	n.d.	0,5 1,5	n.d.	Mcfeters & Barish, 2003
açúcar, passas e alperces secos	Voltametria Cíclica Amperometria (0,894V vs NHE)	128 – 2560 0,256 – 12,8	1,28 0,192	ascorbato, iodeto, sulfureto	Pournaghi – Azar <i>et al.</i> , 2003
vinhos e sumos de frutos	FIA com detecção amperométrica indirecta	0,06 – 3,84	0,1	formaldeído, acetaldeído	Lowinsohn <i>et al.</i> , 2004
vinhos	Fotométrico – reacção com polianilina	0,025 – 1,5	n.d.	n.i.	de Marcos <i>et al.</i> , 2004
vinhos	electroforese de zona com detecção condutimétrica	n.d.	3	n.d.	Masár <i>et al.</i> , 2004
vinhos	ICP-OES	0 – 500	0,3	etanol	Čmelík <i>et al.</i> , 2005
vinhos brancos e tintos	Amperometria (1,094V vs NHE)	0 - 256	0,06	n.i.	García <i>et al.</i> , 2005
alimentos diversos	Fotométrico – reacção com PRA-formaldeído	0,05 – 5	0,05	efeito de matriz na amostra de cerveja	Li & Zhao, 2006
alimentos diversos	Fotométrico – reacção com DTNB	0,1 – 4,3	0,1	Cu <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Li & Zhao, 2006

**Tabela II.2:** Continuação.

damascos secos	Polarografia diferencial pulsada (DPP) – método directo	n.d.	0,1	Cd <sup>2+</sup> - elimina-se com a adição de EDTA	Yilmaz & Somer, 2007
damascos secos	Polarografia diferencial pulsada (DPP) – reacção com SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	n.d.	0,04	Pb <sup>2+</sup>	Yilmaz & Somer, 2007
licores industriais (madeira e papel)	Voltametria cíclica Voltametria diferencial pulsada (DPV) (picos a 0,659V vs NHE)	5,6 – 704 0,26 – 28,3	0,3 0,01	n.i.	Raoof <i>et al.</i> , 2007
licores industriais (madeira e papel)	DPV (picos a 0,779V vs NHE)	8,96 – 32 32 – 429	2,6	n.d.	Ardakani <i>et al.</i> , 2008
água de caldeiras	Amperometria (0,594V vs NHE)	0,32 – 96	0,18	n.i.	Zhou <i>et al.</i> , 2008
-----	Amperometria (0,694V vs NHE)	0,26 – 4,42	0,08	ascorbato, sulfureto	Dadamos & Teixeira, 2009
soluções industriais	DPV (picos a 0,599V vs NHE)	0,04 – 6,4	0,02	sulfureto	Ensafi & Karimi-Maleh, 2010

**Tabela II.3:** Principais características dos biossensores propostos para determinação de sulfitos. GL – gama de linearidade; LD – limite de detecção; n.d.– não determinado; n.i.– não identificado.

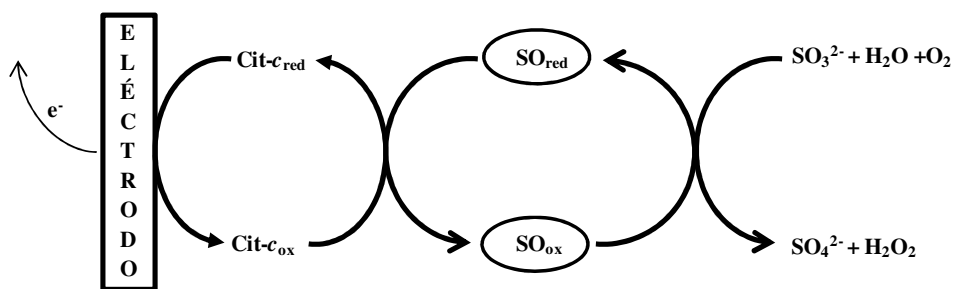
Enzima	Matriz de Imobilização	Transdução / Espécie Monitorizada	LD/ppm	GL/ppm	Sensibilidade (mA M <sup>-1</sup> )	Interferentes	Matriz de Teste	Referência
SO	Politiramina electrodepositada em GC/Pt	Amperométrica (0,5V vs Ag/AgCl) / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gerado	0,05	0,16 – 24	2,7	Ascorbato > 2mM Etanol > 15% v/v Eliminados por Diluição	vinhos	Situmorang <i>et al.</i> , 1999
SO Cit-c	Pasta de grafite <i>Screen-printed</i>	Amperométrica (0,3V vs Ag/AgCl) / oxidação do mediador	4	4,1 - 750	n.d.	n.i.	águas	Abass <i>et al.</i> , 2000
SO	Pasta de grafite	Amperométrica (0,65V vs Ag/AgCl) / diferença entre correntes geradas	n.i.	0,8 – 80	0,654	Etanol > 10% v/v	cervejas	Zhao <i>et al.</i> , 2006
SO	Gelatina + gluteraldeído/ deposição num GCE modificado com um filme de Hg	Amperométrica (-0,24V vs Ag/AgCl) / O <sub>2</sub> consumido	n.d.	16 - 224	n.d.	n.i.	alimentos	Dinçkaya <i>et al.</i> , 2007
SO Cit-c	Polianilina electrodepositada/ deposição em camadas	Amperométrica (0,1V vs Ag/AgCl) / oxidação do mediador	n.d.	0 – 4,8	2,19	Polifenóis do vinho tinto	vinhos	Spricigo <i>et al.</i> , 2009



A revisão bibliográfica apresentada na tabela II.3 demonstra que os biossensores propostos até ao momento têm em comum a transdução por amperometria e a utilização da oxidase do sulfito (SO), enzima que catalisa a reacção 2.3, como elemento de reconhecimento biológico.



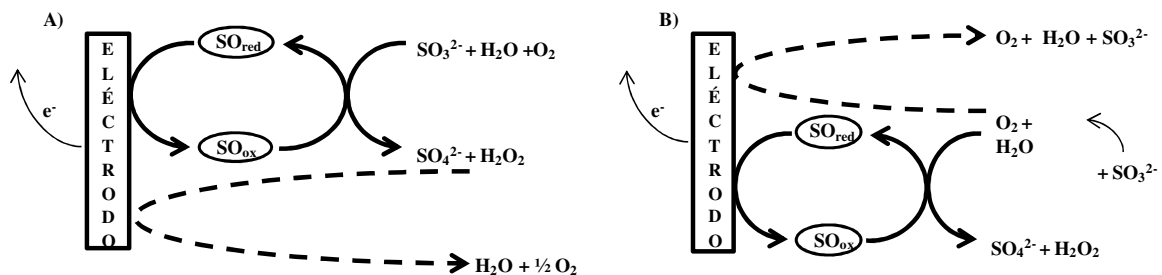
A espécie monitorizada contudo, varia de acordo com a estratégia seguida. Abass *et al.* (2000) e Spricigo *et al.* (2009) propuseram a monitorização do processo de reoxidação do mediador, o citocromo *c*, no eléctrodo de trabalho, de acordo com o esquema representado na figura II.3.



**Fig. II.3:** esquema reaccional dos biossensores de sulfitos baseados no aumento de corrente provocado por acção do mediador na regeneração da SO.

A co-imobilização das proteínas (enzima e mediador) foi conseguida, no primeiro caso, por adição das mesmas à tinta de carbono, posteriormente aplicada em eléctrodos *screen printed*, onde constituía o eléctrodo de trabalho. No segundo caso optou-se por uma deposição em camadas sobre um eléctrodo de Au modificado, sendo o conjunto estabilizado com o auxílio de uma matriz polimérica.

Até ao momento não se encontram reportados biossensores electroquímicos baseados na transferência electrónica directa entre a SO e o eléctrodo de trabalho. Porém, foram apresentados dispositivos que dispensam o recurso a um mediador, através da monitorização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado (Situmorang *et al.*, 1999) e do  $\text{O}_2$  consumido (Dinçkaya *et al.*, 2007) no decurso da reacção enzimática (fig. II.4).



**Fig. II.4:** Representação esquemática de biossensores de sulfitos baseados na actividade da SO. A) Monitorização do peróxido de hidrogénio formado. B) Monitorização do oxigénio consumido.

No primeiro caso, o  $H_2O_2$  gerado na oxidação do sulfito a sulfato, reoxida-se directamente na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo (GC) revestido com platina. Sendo o aumento de corrente medido directamente proporcional á quantidade de sulfito adicionada ao sistema. No segundo caso, o sinal produzido pela redução directa do  $O_2$  na superfície do GC (modificado com uma camada de Hg) sofre uma diminuição resultante da actividade da enzima que, na presença de sulfito, consome parte do oxigénio disponível.

Uma abordagem bastante diferente foi proposta por Zhao *et al.* (2006). Estes autores comparam o valor da corrente gerada pela oxidação inespecífica dos diversos componentes da amostra, com o mesmo valor após a amostra passar por uma camada de SO imobilizada. A enzima oxida o sulfito presente na amostra e a diferença entre correntes medidas é proporcional ao teor da amostra em  $SO_3^{2-}$  atenuando, assim, os efeitos de matriz.

## II.2.2 – Redutases do Sulfito

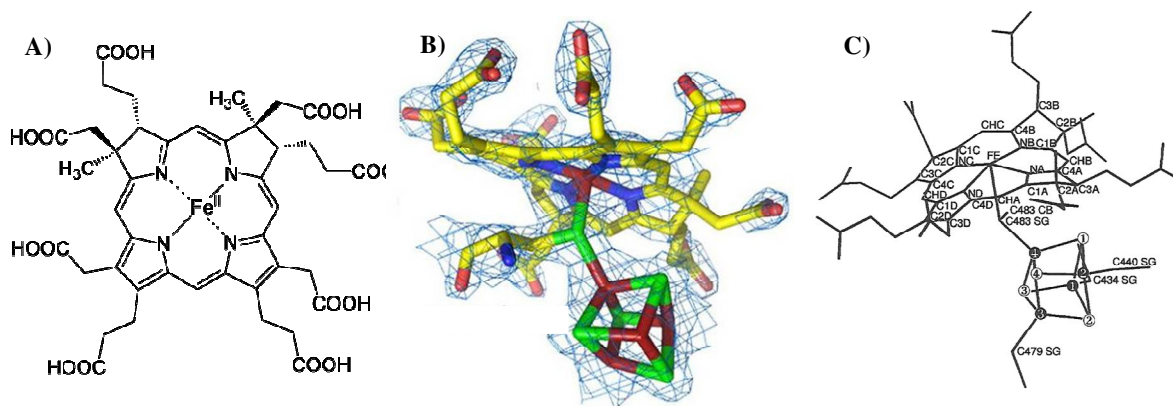
Para além das oxidases do sulfito empregues nos biossensores acima descritos, existem também as redutases do sulfito. Uma classe de enzimas que, como o próprio nome indica, catalisa a reacção de redução do  $SO_3^{2-}$  a sulfureto de acordo com a seguinte equação:



Esta redução é um dos processos fundamentais que possibilita a utilização biológica do enxofre, sendo uma das três reacções conhecidas a nível biológico que implicam uma redução de seis electrões, sendo as restantes a redução do nitrito a amónia catalisada pelas nitrito redutases (NiRs) e a conversão do azoto molecular em amónia pela nitrogenase.

A redução biológica é o único processo capaz de gerar sulfureto a partir do sulfato em condições de pressão e temperatura ambiente, sendo que os ecossistemas anaeróbios compostos pelas bactérias redutoras de sulfato e outros organismos fototróficos e quimiolitotróficos se encontram na base do ciclo biogeoquímico (Crane *et al.*, 1995).

As redutases do sulfito (SiRs) são classificadas como assimilativas ou dissimilativas, de acordo com a sua função biológica. Contudo, ambas as classes possuem em comum não só a reacção que catalisam como também toda uma gama de aspectos estruturais dos quais se evidencia o denominado SNiRR (*sulfite and nitrite reductase repeat*) e a composição do centro activo, designado por sirohemo (fig. II.5), o qual contém uma porfirina reduzida da classe das isobacterioclorinas denominada sirohidroclorina, acoplado através de uma cisteína a um centro [4Fe4S] (Crane & Getzoff, 1996).



**Fig. II.5:** Centro activo das SiRs. **A)** Estrutura do sirohemo (Murphy *et al.*, 1974); **B)** Mapa de densidade e estrutura do centro activo da dSiR de *D. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2008); **C)** Centro activo da SiRHP de *E. coli* (Crane *et al.*, 1997A).

O SNiRR consiste num conjunto de segmentos das sequências de resíduos de aminoácidos altamente conservados, tanto nas SiRs como nas NiRs hemicas. Estes segmentos correspondem a zonas de simetria entre monómeros e são essenciais para assegurar a estabilidade e função das proteínas pertencentes a esta super família (Crane *et al.*, 1995).

A composição do centro activo, nomeadamente no que respeita ao sirohemo, pode ser compreendida quer em termos evolutivos como químicos. No ambiente fortemente redutor onde a redução de sulfito dissimilativa surgiu (há 2350 - 3110 milhões de anos atrás) a estrutura do anel da sirohidroclorina seria mais estável que os hemos insaturados. Estes anéis são também muito melhores doadores electrónicos que as clorinas ou as porfirinas insaturadas e a flexibilidade conformacional conferida pela estrutura saturada permite aos resíduos de aa adjacentes estabelecer um arranjo estabilizador do substrato (Crane & Getzoff, 1996).

### II.2.2.1 – Redutases do Sulfito Assimilativas

As redutases do sulfito assimilativas (aSiR) existem em arqueobactérias, bactérias, fungos e plantas, mas não em animais. A sua função biológica consiste na produção de sulfureto ( $S^{2-}$ ) para posterior incorporação em aminoácidos e co-factores enzimáticos.

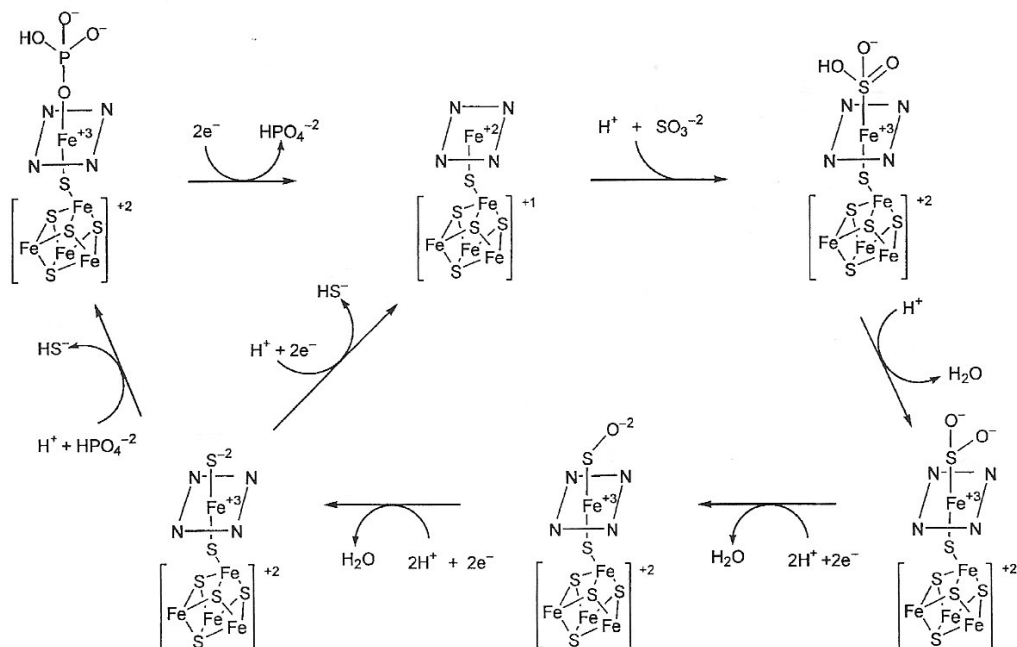
A proteína mais estudada desta classe é a aSiR de *Escherichia coli* (*E. coli*). Trata-se de um oligómero de composição  $\alpha_8\beta_4$  com 784kDa. A subunidade  $\alpha$  (66kDa) é denominada por SiRFP (flavoproteína) e trata-se de uma proteína do mesmo tipo que o citocromo P450 que transfere electrões do NADPH para a subunidade  $\beta$ . Cada molécula de SiRFP possui um local de ligação a uma molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) e uma molécula de flavina mononucleótido (FMN). Porém, quando na forma de octâmero, apenas se encontram ligados quatro co-factores do tipo FAD e quatro do tipo FMN.

A subunidade  $\beta$  (64kDa), conhecida por SirHP (hemoproteína), é a subunidade catalítica e é a que se encontra melhor caracterizada, tanto do ponto de vista espectroscópico (UV/Vis, EPR, Mössbauer e Ressonância Raman) como estrutural, com a estrutura cristalográfica da proteína nativa resolvida em 1995 por Crane *et al.* (fig. II.6), e seguida dos complexos com substratos, inibidores intermediários e produtos em 1997 (Crane *et al.*, 1995; Crane *et al.*, 1997B, Stroupe & Getzoff, 2001).



**Fig. II.6:** Estrutura tridimensional da SiRHP nativa, na forma monomérica (Crane *et al.*, 1995 – PDB-1AOP).

O mecanismo da redução do sulfito catalisada pela SiRHP proposto por Crane *et al.* (1997A) encontra-se esquematicamente representado na figura II.7.



**Fig. II.7:** Mecanismo de redução do  $\text{SO}_3^{2-}$  catalisada pela SiRHP (Strupe & Getzoff, 2001).

De acordo com o mecanismo representado na figura II.7, a redução completa do sulfito a sulfureto ocorre de forma sequencial. O primeiro par de electrões é recebido da flavoproteína e reduz os co-factores, provocando a libertação do fosfato do centro activo (ver fig. II.4) e ocorrendo a subsequente ligação do sulfito ao lado distal do sirohemo através do átomo de enxofre. Seguidamente, são fornecidos dois protões ao substrato, provenientes da cadeia lateral da SiRHP. O sistema é estabilizado através de pontes de hidrogénio. Este processo repete-se por duas vezes, até serem fornecidos ao substrato os 6 electrões necessários. A cedência dos últimos dois protões causa a libertação do produto ( $\text{HS}^-$ ) e a ligação de uma nova molécula de fosfato ao centro activo, completando assim o ciclo catalítico (Crane *et al.*, 1997A; Strupe & Getzoff, 2001).

### II.2.2.2 – Redutases do Sulfito Dissimilativas

A redução de sulfito a sulfureto é um passo essencial do processo anaeróbio de respiração de sulfato. Assim, as redutases do sulfito dissimilativas (dSiR – EC 1.8.99.3) existem em todas as bactérias redutoras de sulfato (Klein *et al.*, 2001). Foi também identificada uma dSiR na bactéria anaeróbia restrita *Bilophila wadsworthia* (Laue *et al.*, 2001), tendo sido igualmente encontradas enzimas deste tipo em organismos hipertermófilos pertencentes ao reino *Archea*, nomeadamente nos *Archaeoglobus profundus* (Larsen *et al.*, 1999) e *Archaeoglobus fulgidus* (Dahl *et al.*, 1993). Existem ainda alguns organismos que possuem dSiRs que catalisam a reacção oposta (oxidação do sulfureto a sulfito) no decurso dos processos de respiração oxidativa como é o caso da bactéria fototrófica *Chromatium vinosum* (Schedel *et al.*, 1979) e da quimiolitotrófica exclusiva *Thiobacillus denitrificans* (Schedel *et al.*, 1975); estas enzimas são, por vezes, referidas na literatura com SiRs reversas (rSiRs).

Quatro tipos distintos de dSiR foram isolados até ao momento: a desulfovirdina (Dsv), que será alvo de descrição pormenorizada nas secções seguintes; a desulforubidina (Lee *et al.*, 1973; Moura *et al.*, 1988; Dervartanian, 1994; Larsen *et al.*, 2000); a desulfofusicidina (Hatchikian & Zeikus, 1983; Hatchikian, 1994) e o P582 (Trudinger, 1970; Akagi, 1983) embora cada uma com um grau de caracterização bastante variável.

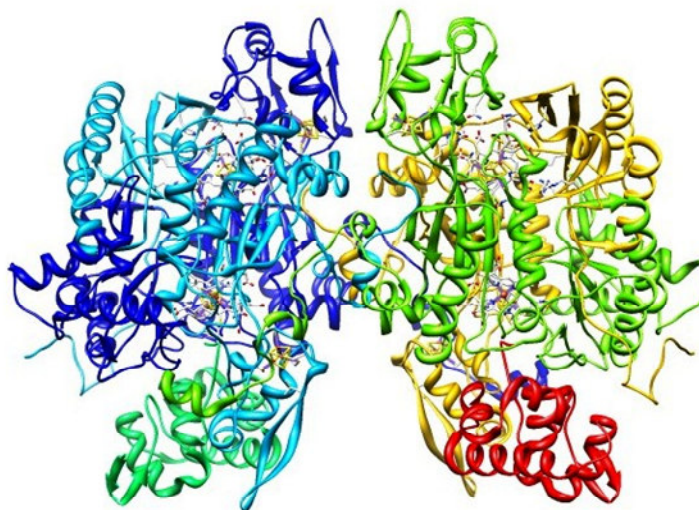
Ainda que diferindo nas suas propriedades espectroscópicas, mobilidades electroforéticas e propriedades redox, todas as dSiR caracterizadas até ao momento apresentam, para além dos grupos prostéticos característicos das SiR, pelo menos duas cadeias polipeptídicas com um arranjo estrutural de configuração  $\alpha_2\beta_2$ . Os genes que codificam estas duas subunidades encontram-se adjacentes um ao outro nos genomas respectivos e provavelmente advêm da duplicação de um gene ancestral (Dahl *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2001).

A análise comparativa das sequências dos genes *dsrAB* foi utilizada na investigação da história evolutiva da respiração de sulfato. A presença de homólogos *dsrAB* em pelo menos cinco linhagens procariontes altamente divergentes e a onipresente congruência filogenética entre as árvores dos genes *dsrAB* e do 16S rRNA sugerem que as dSiRs existentes actualmente nos procariontes redutores de sulfato são fruto de uma evolução vertical a partir de genes protogénicos ancestrais comuns (Wagner *et al.*, 1998). Contudo, trabalhos posteriores têm vindo a provar que estes genes foram alvo de transferências laterais com uma frequência muito superior ao que era inicialmente postulado (Larsen *et al.*, 1999, 2000; Klein *et al.*, 2001).

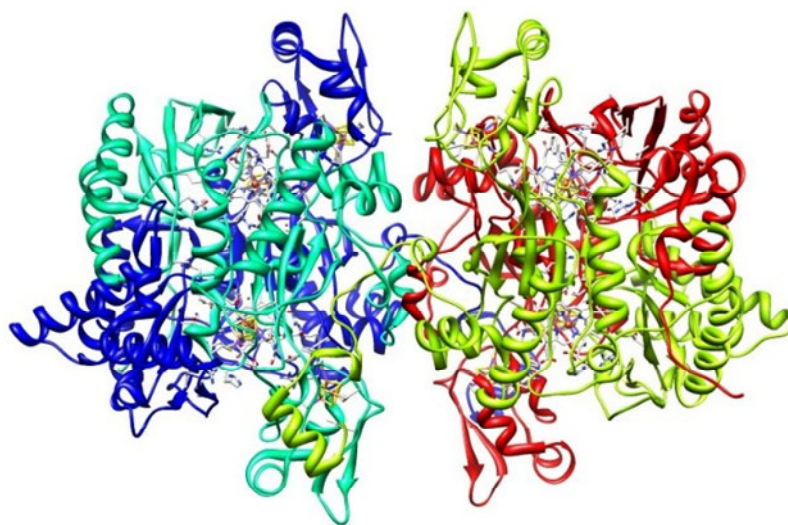
### II.2.2.3 – A Desulfoviridina

A desulfoviridina é a dSiR presente nas bactérias do género *Desulfovibrio*. A sua ocorrência porém, não se encontra limitada a estes organismos, tendo sido igualmente identificada na bactéria *Bilophila wadsworthia* (família *Desulfovibrionaceae*) (Laue *et al.*, 2001) e no organismo hipertermófilo *Archaeoglobus fulgidus* (Dahl *et al.*, 1993).

A recente resolução das estruturas cristalográficas das Dsv de *D. vulgaris* (fig. II.8) e *A. fulgidus* (fig. II.9) veio clarificar toda uma série de informações contraditórias que, ao longo dos anos, surgiram na literatura no que respeita às propriedades desta enzima.



**Fig. II.8:** Estrutura tridimensional da Desulfoviridina de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, na forma de complexo  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ , no estado nativo (Oliveira *et al.*, 2008 – PDB-2V4J).

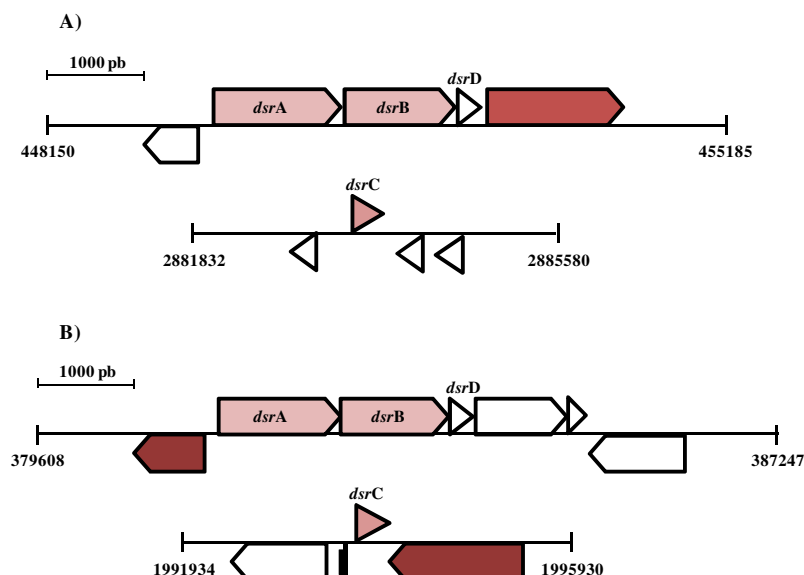


**Fig. II.9:** Estrutura tridimensional da Desulfoviridina de *Archaeoglobus fulgidus*, na forma de complexo  $\alpha_2\beta_2$ , no estado nativo (Schiffer *et al.*, 2008 – PDB-3MMC).

#### II.2.2.3.1 – Caracterização Estrutural

Até há 20 anos atrás, considerava-se que todas as dSiR possuíam a mesma configuração estrutural. Estas proteínas eram tetrâmeros com aproximadamente 200kDa, de configuração  $\alpha_2\beta_2$  ( $\alpha \approx 55$ kDa;  $\beta \approx 45$ kDa). A descoberta da existência de uma nova subunidade, denominada  $\gamma$ , na proteína purificada de *D. vulgaris* Hildenbourogh, conjuntamente com a confirmação da sua existência nas proteínas correspondentes de *D. vulgaris* oxamicus, *D. gigas* e *D. desulfuricans* ATCC 27774, conduziu ao estabelecimento de uma nova conformação multimérica ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  com  $\alpha \approx 50$ kDa;  $\beta \approx 45$ kDa e  $\gamma \approx 11$ kDa) para as Dsv das bactérias pertencentes ao género *Desulfovibrio* (Pierik *et al.*, 1992). Contudo, em diversas bactérias redutoras de sulfato, o gene *dsrC* encontra-se localizado num operão diferente do *dsrAB* (fig. II.10A) e a sua expressão não é regulada de forma coordenada (Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1993).





**Fig. II.10:** Estrutura dos operões dos genes *dsrAB* e *dsrC*. **A)** *D. vulgaris* Hildenbourogh; **B)** *A. fulgidus* (KEEG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Existem ainda diversas dSiR que não contêm a subunidade  $\gamma$ , embora todos os organismos que possuem os genes *dsrAB* possuem igualmente o gene *dsrC*. Um bom exemplo deste facto é a Dsv de *Archaeoglobus fulgidus*, a qual não possui a subunidade  $\gamma$  (Schiffer *et al.*, 2008), mas cuja estrutura cristalográfica da proteína codificada pelo *dsrC* se encontra resolvida (Mander *et al.*, 2005).

Assim, as evidências apontam para que a pequena proteína de 11kDa não seja verdadeiramente uma subunidade da Dsv, mas sim uma proteína com a qual interage, formando um complexo. Diferenças na intensidade de tal interacção poderão estar na origem da divergência conformacional encontrada nas Dsv de *Desulfovibrio* isoladas até ao momento, pois sendo verdade que a proteína é isolada na forma  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  nas espécies *D. vulgaris* Hildenbourogh e, como irá ser demonstrado em seguida (secção II.4.2.1), *D. desulfuricans* ATCC 27774, tal só aconteceu parcialmente na Dsv de *D. desulfuricans* Essex (Steuber *et al.*, 1995) e, não foi, até ao momento, observado na enzima de *D. gigas* (Moura *et al.*, 1988).

Não sendo ainda conhecida a função biológica da proteína codificada pelo *dsrC*, há ainda um outro elemento a ter em consideração: a proteína codificada pelo gene *dsrD* (Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1995). O gene *dsrD* codifica uma pequena proteína com apenas 78 resíduos de aminoácidos, faz parte do mesmo operão que os *dsrAB* e, tal como estes, é altamente conservado. Embora a proteína de *D. vulgaris* Hildenborough tenha já sido sobreexpressa (Hittel & Voordouw, 2000) e a sua estrutura cristalográfica se encontre resolvida (Mizuno *et al.*, 2003), não existem, até ao momento, evidências da sua expressão *in vivo*.

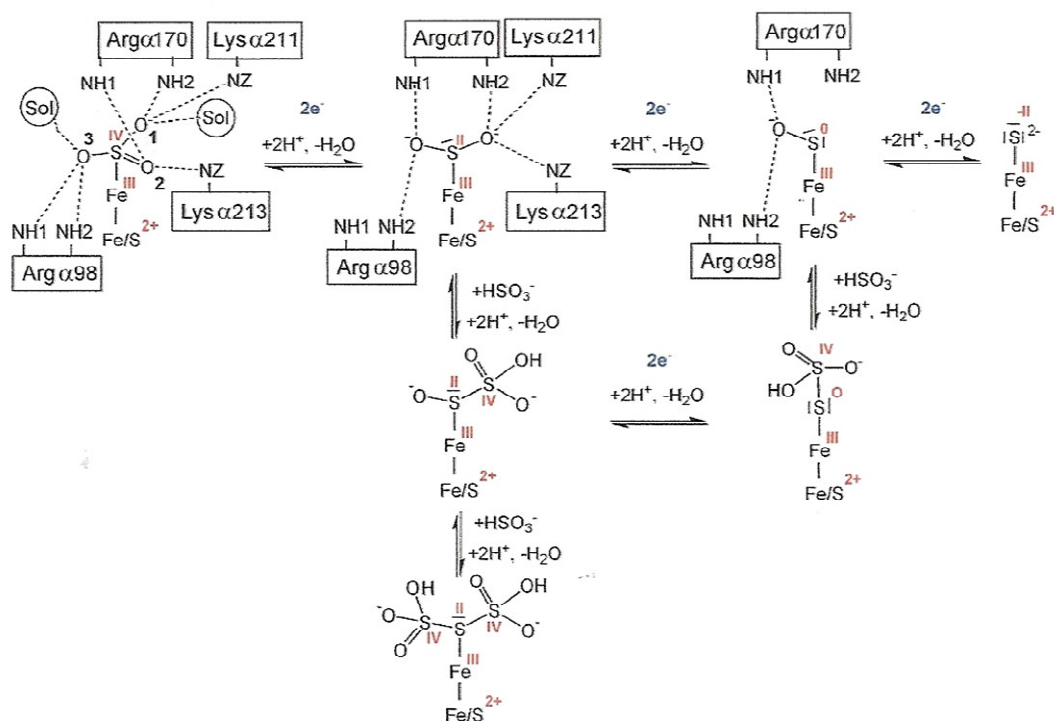
Um dos aspectos mais controversos do processo de caracterização da Dsv prende-se com a natureza e composição em co-factores. A caracterização bioquímica e espectroscópica da Dsv de *D. gigas* conduzida por Moura *et al.* (1988) apontava para a existência de duas tetrahidroporfirinas (20 a 40% na forma de sirohemo) e quatro centros [4Fe4S], dos quais dois ligados às porfirinas, por molécula de complexo. Os resultados obtidos nesse trabalho foram posteriormente corroborados por trabalhos de caracterização das Dsv de *D. vulgaris* Hildenborough (Wolf *et al.*, 1994; Marrit & Hagen, 1996) e *D. desulfuricans* Essex (Steuber *et al.*, 1995). A análise da sequência de resíduos de aminoácidos, proveniente da tradução do *dsvAB* de *Archaeoglobus fulgidus* demonstrou que, na subunidade  $\beta$ , não existia o motivo de ligação típico (Cys-X<sub>5</sub>-Cys)-X<sub>n</sub>-(Cys-X<sub>3</sub>-Cys) para o cofactor sirohemo-[4Fe4S] (Dahl *et al.*, 1993). Atendendo à ausência desse motivo também nas sequências das bactérias *Desulfovibrio* estudadas, considerou-se que a subunidade  $\alpha$  ( $\approx$  50kDa) continha o centro activo da enzima (sirohemo/sirohidroclorina acoplado ao centro [4Fe4S]) e a subunidade  $\beta$  ( $\approx$  40kDa) possuía um segundo centro [4Fe4S].

Uma vez mais, a resolução das estruturas cristalográficas das Dsv de *D. vulgaris* e *A. fulgidus* vieram clarificar tal assumpção, apresentado um novo conjunto de dados no que respeita à composição e distribuição dos co-factores na Dsv. Com efeito, ambas as proteínas possuem em cada uma das subunidades do multímero  $\alpha_2\beta_2$  uma sirohidroclorina ligada a um centro [4Fe4S] e um segundo centro [4Fe4S], ao contrário do que foi previsto pela análise da estrutura primária. Descobriu-se que não só a subunidade  $\beta$  alberga também um sirohemo acoplado a um centro [4Fe4S] (com um motivo de ligação até agora desconhecido) como esse é, efectivamente, o centro activo da enzima.

Na proteína de *A. fulgidus* todas as porfirinas se encontram na forma de sirohemo porém, os sirohemos das subunidades  $\alpha$  apresentam o acesso ao centro activo bloqueado por resíduos de triptofano (Schiffer *et al.*, 2008). Na enzima de *D. vulgaris* apenas as subunidades  $\beta$  possuem sirohemos, as subunidades  $\alpha$  contêm apenas sirohidroclorinas (Oliveira *et al.*, 2008).

## II.2.2.3.2 – Mecanismos de Reacção

Não obstante a importância fulcral que esta enzima desempenha no metabolismo respiratório de sulfato, existem muitos aspectos relacionados com a actividade da Dsv que permanecem incertos. Um desses aspectos é a natureza do produto fisiológico uma vez que, ao contrário das aSiR que convertem sulfito em sulfureto sem que ocorra libertação de intermediários (Siegel *et al.*, 1974; Crane *et al.*, 1997A), a Dsv produz, *in vitro*, uma mistura de sulfureto, tritionato e tiosulfato em proporções que dependem das condições do ensaio (Peck Jr. & LeGall, 1982; Akagi, 1995). Um estudo recente, levado a cabo por Parey *et al.* (2010), propõe um mecanismo para a reacção de redução do sulfito com base nas estruturas cristalográficas da Dsv de *A. fulgidus* complexada com uma série de ligandos aniónicos (fig. II.11).

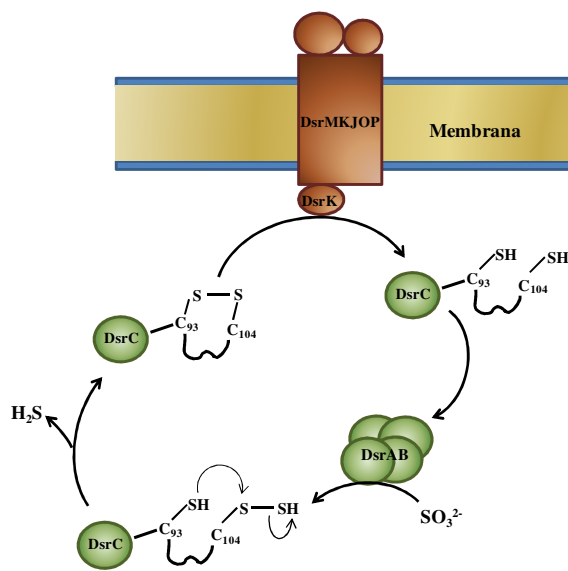


**Fig. II.11:** Mecanismo de redução do  $\text{SO}_3^{2-}$  catalisada pela Dsv de *A. fulgidus* (Parey *et al.*, 2010). O mecanismo consiste em três etapas sequenciais, ocorrendo em cada uma das etapas, a transferência de 2 electrões para o substrato seguida da dupla protonação de um dos átomos de oxigénio do substrato e subsequente libertação de uma molécula de água (desidratação).

O mecanismo representado na figura II.11 é, na verdade, muito semelhante ao proposto por Crane *et al.* (fig. II.5) para a redução sequencial (3x2 electrões) do  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$ . Contudo, estes autores apresentam ainda uma proposta que visa explicar o facto de a Dsv possuir a capacidade de gerar e converter tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) e tritionato ( $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ ). De acordo com estes autores, estes intermediários podem formar-se após a primeira etapa da redução, por reacção entre a espécie ligada ao centro activo e uma segunda molécula de sulfito que entretanto se aproxime.

Para além de viável do ponto de vista estrutural, esta explicação é concordante com as observações previamente reportadas, as quais indicavam a produção de uma maior quantidade destes compostos em condições de excesso de substrato e pHs mais ácidos.

No caso da enzima de *D. vulgaris*, a proximidade entre a penúltima cisteína (Cys $\gamma$ 104) do C-terminal da subunidade  $\gamma$  (ou DsrC) e o anel do sirohemo, conduziu Oliveira *et al.* (2008) a proporem um mecanismo alternativo (fig. II.12) no qual a DsrC surge, não como parte integrante da Dsv, mas sim como seu parceiro fisiológico.



**Fig. II.12:** Representação esquemática do mecanismo proposto para a redução do  $\text{SO}_3^{2-}$  catalisada pela Dsv de *D. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2008).

Estes autores propõem que a Dsv ( $\alpha_2\beta_2$ ) promova a redução não de 6, mas sim de 4 electrões, do sulfito, sendo o intermediário assim formado ( $\text{S}^0$ ) transferido para a DsrC formando um persulfureto. A DsrC dissocia-se então da Dsv e reduz o persulfureto, libertando  $\text{H}_2\text{S}$  e oxidando-se, com a formação de uma ponte persulfureto entre as cisteínas Cys $\gamma$ 93 e Cys $\gamma$ 104.

A DsrC oxidada pode, então, regenerar-se por redução no complexo membranar DsrMKJOP, o qual possui uma subunidade catalítica citoplasmática (DsrK) que contém um centro FeS cuja função putativa consiste, precisamente, na redução de ligações persulfureto.

Existe porém, uma discrepância entre o mecanismo proposto e a estrutura tridimensional do complexo. A interação entre a Cys $\gamma$ 104 e o sirohemo não é lábil. Trata-se de uma ligação covalente S-C que dificilmente permitiria o tipo de mecanismo indicado. Embora este tipo de ligação não seja inédito, poderia tratar-se de um artefacto resultante da oxidação da proteína aquando da sua purificação. Contudo, cristais obtidos a partir de Dsv purificada anaerobicamente também apresentaram esta característica estrutural (Oliveira *e tal*, 2008).

Não se tratando de um artefacto de purificação, levanta-se ainda a hipótese de esta ligação ser resultado de um artefacto da cristalização. Para além disso, não existe ainda uma estrutura resolvida para a Dsv na forma reduzida, não sendo portanto possível determinar se ocorrem, ou não, alterações conformacionais significativas entre os estados nativo e activo da enzima. Em todo o caso, a viabilidade do mecanismo proposto não está posta em causa. A continuação do seu estudo irá, certamente, revelar aspectos que clarifiquem finalmente o mecanismo da redução do sulfito catalisada pela desulfovirdina.

## II.3 – Materiais e Métodos

### II.3.1 – Materiais e Reagentes

#### II.3.1.1 – Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilativa *Desulfovibrio*

O tris(hidroximetil)aminometano (Tris base;  $C_4H_{11}NO_3$ ;  $121,14 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,9\%$ ), o ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico (CAPS;  $C_9H_{19}NO_3S$ ;  $221,32 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 98\%$ ), o n-dodecil-sulfato de sódio (SDS;  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ;  $288,4 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ), o formaldeído ( $CH_2O$ ;  $30,03 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $37\%$ ), o glutraldeído ( $OHC(CH_2)_3CHO$ ;  $100,12 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $25\%$ ), a hidroxilamina ( $NH_2OH.HCl$ ;  $69,49 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $98\%$ ), o acetato de amônia ( $CH_3CO_2NH_4$ ;  $77,08 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $98\%$ ), a 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ;  $C_{18}H_{12}N_6$ ;  $312,33 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 98\%$ ), a glutatona na forma reduzida ( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ ;  $307,3 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $98-100\%$ ) e o nitrato de prata ( $AgNO_3$ ;  $169,87 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,8\%$ ) foram fornecidos pela Sigma. O ácido clorídrico ( $HCl$ ;  $36,46 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $37\%$ ), o acetato de sódio ( $CH_3CO_2Na.3H_2O$ ;  $136,08 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,5\%$ ), o hidróxido de sódio ( $NaOH$ ;  $40,00 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ), o ácido acético ( $CH_3CO_2H$ ;  $60,05 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,8\%$ ) e o etanol ( $CH_3CH_2OH$ ;  $46,07 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,8\%$ ) são da Riedel-deHaën. O ácido bórico ( $H_3BO_3$ ;  $61,86 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99,8\%$ ) foi fornecido pela Pronolab. O glicerol ( $C_3H_8O_3$ ;  $92,10 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 87\%$ ) é da Panreac. O ácido tricloroacético (TCA;  $Cl_3CCOOH$ ;  $163,39 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $99\%$ ) foi fornecido pela Alfa Aesar. O ditionito de sódio ( $Na_2S_2O_4$ ;  $174,11 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 87\%$ ), o cloreto de ferro II ( $FeCl_2.4H_2O$ ;  $198,75 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ), o etilenodiamina-tetraacetato de sódio (EDTA;  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ ;  $372,24 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 99\%$ ), o metanol ( $CH_3OH$ ;  $32,04 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $99\%$ ), o tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ;  $248,21 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $99,5\%$ ) e o azul de Coomassie R-250 ( $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ ) foram adquiridos à Merck. O tioglicolato de sódio ( $HSCH_2COONa$ ;  $114,10 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $97\%$ ) foi fornecido pela Aldrich. A coluna pré-empacotada Superdex 200 HR 10/30 é da GE Healthcare. A resina de permuta aniônica DE-52 é da Whatman. As resinas Source-15Q, Superdex 200 (grau preparativo), a coluna pré-empacotada Superdex 200 HR 10/30, as proteínas padrão usadas na determinação da massa molecular (MM: 13,7 a 1338 kDa) e os marcadores de massa molecular utilizados nas electroforeses (LMW - 14,4 a 97 kDa) são da Amersham Biosciences. As colunas XK-26/40 e XK-26/100 são provenientes da Pharmacia. As membranas de diálise ( $\varnothing = 25,4 \text{ mm}$ ; capacidade de  $5 \text{ ml cm}^{-1}$ ; cut-off 12 a 14 kDa) foram fornecidas pela Viskin, as membranas YM3, YM30 e PVDF (Immobilon<sup>TM</sup> – PSQ *Transfer Membrane*) foram adquiridas à Millipore e os filtros de seringa com membranas de  $0,45\mu\text{m}$  foram fornecidos pela VWR International.

Os reagentes utilizados na preparação dos géis para electroforese e os marcadores de massa molecular (Broad-Range: 7,3 a 211,8 kDa) foram adquiridos à Bio-Rad.

Os reagentes para a quantificação de proteína são provenientes de um kit, para quantificação pelo método do BCA (Pierce). A albumina de soro bovino (BSA), utilizada como padrão é da Sigma-Aldrich.

As soluções padrão utilizadas em ICP-AES foram preparadas por diluição de uma solução mãe adquirida à Reagecom.

### II.3.1.2 – Determinação da Estrutura Primária

A digestão da proteína para a sequenciação de péptidos foi realizada com tripsina de pâncreas bovino (Roche). Os eluentes para a separação cromatográfica dos péptidos foram constituídos por água desionizada, acetonitrilo (E Chromasolv, HPLC grade da Sigma-Aldrich) e ácido trifluoroacético (TFA, *N-Terminal Sequencing Reagent*, Applied Biosystems).

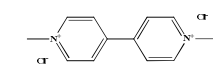
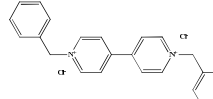
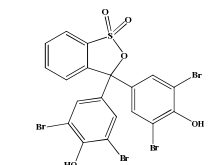
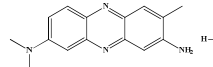
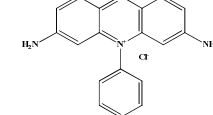
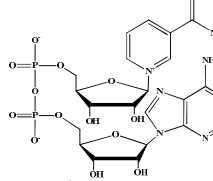
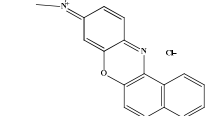
As reacções de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificação do ADN foram realizadas recorrendo a *primers* fornecidos pela Sigma e à polimerase de ADN (*Taq* DNA Polymerase) da Amersham Biosciences. Para as electroforeses em gel de agarose recorreu-se a marcadores GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (de 3000 a 100 pares de bases) da Fermentas e ao intercalador de ADN SyBr® Safe DNA Gel Stain, fornecido pela Invitrogen. A purificação dos fragmentos de ADN foi realizada recorrendo a um kit de purificação da QIAquick.

### II.3.1.3 – Electroquímica

As soluções foram preparadas com água desionizada (dH<sub>2</sub>O; 18 MΩcm) obtida de um sistema de purificação de água MilliQ da Millipore. O 4-morfolineetanossulfonato de sódio (MES; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NNaO<sub>4</sub>S; 217,22 g mol<sup>-1</sup>), o tris(hidroximetil)aminometano (Tris base; C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>; 121,14 g mol<sup>-1</sup>; ≥99,9%) e o etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH; 46,07 g mol<sup>-1</sup>; 96%) são da Sigma. O sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; 126,04 g mol<sup>-1</sup>; ≥98%) foi adquirido à Fluka. O cloreto de potássio (KCl; 74,56 g mol<sup>-1</sup>; ≥99,5%) foi fornecido pela Merck. O ácido clorídrico (HCl; 36,46 g mol<sup>-1</sup>; 37%) é da Riedel-deHaën. As membranas de diálise (limite de exclusão 3 500 Da) são da Spectra/Por® e a pasta de alumina foi adquirida à Buehler.

Os mediadores electroquímicos artificiais encontram-se descritos na tabela II.4.

**Tabela II.4:** Mediadores electroquímicos utilizados neste trabalho. Os dados apresentados foram recolhidos de “*The Merck Index*”, 1999; excepto (a) – Strehlitz *et al.*, 1994; (b) - Mariotti *et al.*, 2006 e (c) – Saleh *et al.*, 2011.

Designação Comercial	Nome	Fórmula Química	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em H <sub>2</sub> O (g l <sup>-1</sup> )	E <sup>0</sup> (mV vs NHE)	pK <sub>a</sub>	Estrutura	Marca
viologénio de metilo	dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	257,20	muito solúvel	-440 (a)			Sigma
viologénio de benzilo	dicloreto de 1,1'-dibenzil-4,4'-bipiridínio	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	409,35		-345 (a)			Sigma
azul de bromofenol	4,4'-(1,1-dioxido-3 <i>H</i> -2,1-benzoxatíole-3,3-diil)bis(2,6-dibromofenol)	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	669,99	4	-455 (a)			Merck
vermelho neutro	hidrocloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	288,78	50	-325(a)	6,7		Merck
fenosafranina	Cloreto de 3,7-diamino-5-fenilfenazina-5-ium	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub>	322,79	solúvel	-255(a)			Sigma
NADH	β-nicotinamida adenina di-nucleotido	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>7</sub> P <sub>2</sub> Na <sub>2</sub>	709,40	solúvel	-365(c)			Sigma
azul de Meldola	cloreto de <i>N</i> -(9 <i>H</i> -benzo[ <i>a</i> ]fenoxazina-9-ilideno)- <i>N</i> -metilmetanaminium	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>20</sub> ·0,5ZnCl <sub>2</sub>	378,93		69 – 193(b)	4 – 5		Sigma



## II.3.2 – Equipamentos

### II.3.2.1 – Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilatória Desulfoviridina

As soluções tampão utilizadas no decurso da purificação foram preparadas com água destilada proveniente de um sistema Automatic type II water ( $2,7\mu\text{Scm}^{-1}$ ) da Wasserlab.

O pH das soluções foi aferido num dispositivo da Crison (Micro pH 2002), equipado com um eléctrodo medidor de pH modelo 5209 da mesma marca.

As cromatografias a alta pressão foram realizadas num sistema cromatográfico Äkta Basic da Amersham Pharmacia biotech, controlado pelo *software* unicorn 5.11 da GE Healthcare.

A espectrofotometria de UV/Vis foi efectuada em espectrofotómetros UV-160A e UV-1800, ambos da Shimadzu.

As electroforeses foram realizadas em sistemas de pH descontínuo, segundo o método de Laemmli, em tinas de electroforese Mini-PROTEN® 3, da Bio-Rad (mini-gel: 8 x 7 x 0,75 cm). A transferência electroforética das subunidades da Dsv para uma membrana de PVDF foi realizada recorrendo a um sistema semi-seco da Bio-Rad (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell).

A espectroscopia de emissão atómica, utilizando uma fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) foi realizada num dispositivo da Jobin Yvin-Horiba.

### II.3.2.2 – Determinação da Estrutura Primária

A sequenciação do N-terminal das três subunidades da Dsv foi num sistema de sequenciação Procise<sup>(TM)</sup> Sequencing System da Applied Biosystems, composto por um sequenciador modelo 491 acoplado a um detector UV/Vis modelo ABI785A e controlado através dos programas Procise<sup>(TM)</sup> e SequencePro<sup>(R)</sup> Data Analysis Application v2.1.

A separação dos péptidos foi feita por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) num cromatógrafo da Hitachi (bomba L-7100, detector UV L-7400 e controlador D-7000) equipado com uma coluna de fase reversa C-18 Lichrocart Purospher Star. A liofilização das fracções resultantes foi realizada num Freeze Dryer Modulyo Pirani 10 da Edwards.

As reacções de PCR foram efectuadas num *termal cycler* (MyCycler<sup>TM</sup>) da Bio-Rad). As electroforeses em gel de agarose foram realizadas num sistema miniRun GE-100 da Bioer Technology co., Ltd.

### II.3.2.3 – Electroquímica

O eléctrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE – *glassy carbon electrode*,  $\varnothing = 3$  mm), o eléctrodo de referência (eléctrodo saturado de Calomelanos SCE – *saturated calomel electrode*, -24 2mV vs NHE – *normal hydrogen electrode*) e o contra-eléctrodo de platina (Pt) foram fornecidos pela Radiometer. As células electroquímicas modelo 6.14.15.210 foram adquiridas à Methrom.

O banho de ultra-sons, utilizado na limpeza dos eléctrodos de trabalho é da Branson (modelo 1510). As medições foram realizadas num potenciostato Autolab PSTAT 12 da Eco-Chimie, controlado através do *software* GPES 4.9.

## II.3.3 – Procedimentos Experimentais

### II.3.3.1 – Purificação e Caracterização Bioquímica da redutase do sulfito dissimilatória Desulfovibrindina

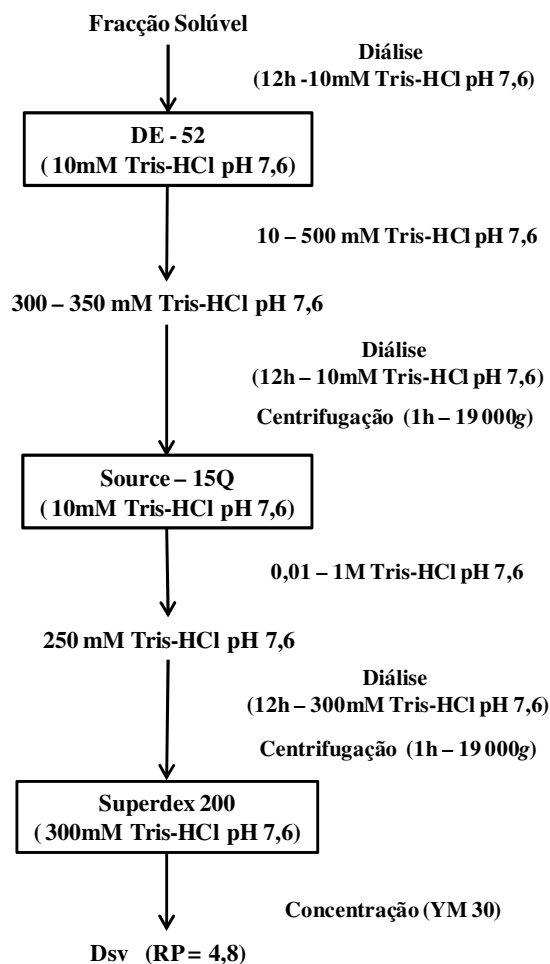
A redutase do sulfito dissimilatória, também conhecida por desulfovibrindina (Dsv) foi purificada da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 com base no método descrito por Moura *et al.* (1988), ao qual se efectuaram modificações, de acordo com o esquema de purificação apresentado na figura II.13.

As células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foram crescidas na Unité de Fermentation do LCB-CNRS, em Marselha, França. A fracção solúvel foi obtida a partir do extracto bruto de acordo com o descrito por Rivas *et al.* (2009).

O extracto solúvel foi submetido a um protocolo de purificação composto por três passos cromatográficos. Todas as etapas do processo foram realizadas em meio aeróbio e a 4°C. A fracção solúvel foi submetida a diálise durante cerca de 12 horas em 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,6 e aplicada numa coluna DE-52 equilibrada na mesma solução. As proteínas foram eluídas com um gradiente 10 a 500 mM Tris-HCl, pH 7,6. A fracção composta maioritariamente por Dsv foi eluída a uma força iónica compreendida entre 300 e 350 mM.

A fracção foi dialisada durante cerca de 12 h em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, centrifugada durante 1 hora a 19000 g e carregada numa coluna Source-15Q. Procedeu-se à eluição sob pressão, com um gradiente 0,01 a 1 M Tris-HCl, pH 7,6, seguida espectrofotometricamente a 280nm. A fracção eluída a aproximadamente 250 mM Tris-HCl foi novamente dialisada em 300 mM tampão Tris-HCl, pH 7,6 e, após nova centrifugação, aplicada em alíquotas de 5ml numa coluna Superdex 200 equilibrada em 300 mM tampão Tris-HCl, pH 7,6; sendo a eluição realizada sob pressão com solução tampão de composição idêntica.

As fracções obtidas após as sucessivas injecções foram analisadas em termos de pureza através de electroforese SDS-PAGE e espectrofotometria, tendo-se procedido à reunião das fracções que apresentavam graus de pureza semelhantes. A proteína purificada foi concentrada, aliquoteada e armazenada a -20°C.



**Fig. II.13:** Esquema de purificação para a Desulfovibridina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Os géis resultantes das electroforeses foram corados rotineiramente com Azul Brilhante de Coomassie R-250 e, sempre que necessário, recorreu-se ao método de coloração com nitrato de prata, ambos descritos no manual técnico da Amersham (1999). A transferência electroforética foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dunbar (1994).

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1975) e/ou pelo método do ácido biciconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985; Wicchelman *et al.*, 1988).

A massa molecular da proteína nativa foi estimada por cromatografia de filtração em gel a alta pressão com recurso a uma coluna pré-empacotada equilibrada com 100 mM NaCl em 50 mM tampão Tris-HCl, pH 7,6, o qual foi também utilizado como eluente, com um fluxo de 0,5 ml/min. O cromatograma foi traçado seguindo a absorvância a 280 nm. A curva de calibração foi construída com base nos tempos de retenção de 8 proteínas padrão.

As massas moleculares das subunidades foram determinadas por electroforese SDS-PAGE a partir de um gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com nitrato de prata. A curva de calibração foi construída recorrendo a dois conjuntos de marcadores de massa molecular.

Os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) a 280, 390, 408, 580 e 630 nm foram determinados por espectrofotometria e calculados com base nos dados de concentração de proteína e massa molecular obtidos experimentalmente.

O conteúdo total de átomos de ferro existentes na proteína foi determinado por ICP-AES, com uma curva de calibração traçada a partir de soluções padrão.

A fracção de átomos de ferro lábil presente na Dsv foi obtida por precipitação com tripiridil-s-triazina (TPTZ) através de uma adaptação do método espectrofotométrico descrito por Fisher e Price (1964).

### **II.3.3.2 – Determinação da Estrutura Primária**

A sequenciação do N-terminal das três subunidades da Dsv foi realizada após a separação das mesmas por electroforese SDS-PAGE e sua subsequente transferência para uma membrana de PVDF por *electroblotting*. As bandas correspondentes a cada subunidade foram excisadas da membrana e processadas individual e directamente num sistema onde foi realizada a sequenciação automática pelo método de degradação de Edman.

A proteína purificada foi liofilizada e submetida a digestão trípica, de acordo com o procedimento descrito por Stone & Williams (1993). Os péptidos resultantes foram separados por HPLC com um gradiente de água desionizada e acetonitrilo, acidificados com 0,1% de TFA. A separação foi monitorizada a 220 nm. Os péptidos que apresentavam melhor resolução cromatográfica foram liofilizados e submetidos a sequenciação química.

A sequenciação do ADN respeitante à codificação da Dsv foi efectuada com recurso a reacções de PCR para amplificação do ADN de interesse, seguido da sua purificação. Após proceder ao alinhamento das sequências genéticas respeitantes à codificação das três subunidades da proteína provenientes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio desulfuricans* G20 e *Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6 foram desenhados *primers* para cada uma delas, sendo que a heterogeneidade das sequências observada nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  conduziu à opção de utilizar *primers* degenerados.

O ADN de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 utilizado como matriz para a reacção de PCR foi extraído directamente por recuperação do sobrenadante após ligeira centrifugação de uma cultura de células submetidas a lise por tratamento térmico.

A amplificação do ADN foi realizada em condições seleccionadas com base nas notas técnicas facultadas pela Amersham Biosciences e optimizadas para cada uma das subunidades:

Subunidade $\alpha$ :	Subunidade $\beta$ :	Subunidade $\gamma$ :
5 min. a 95°C	5 min. a 95°C	5 min. a 95°C
1 min. a 95°C	1 min. a 95°C	1 min. a 95°C
30 s a 62°C	30 s a 56°C	30 s a 57°C
2 min. a 72°	2 min. a 72°	2 min. a 72°C
8 min. a 72°C	8 min. a 72°C	
} x35	} x35	} x35

O sucesso da amplificação foi avaliado por electroforese em gel de agarose a 1%. No caso das subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  procedeu-se à purificação dos fragmentos de ADN directamente da mistura reaccional e, no caso da subunidade  $\beta$  a purificação foi realizada após electroforese do produto de PCR, por excisão da banda correspondente ao fragmento de interesse de um gel de agarose a 2%. Os fragmentos de ADN purificados foram entregues à empresa STABvida para sequenciação.

### II.3.3.3 – Electroquímica

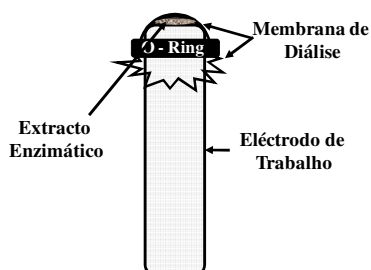
Todos os ensaios electroquímicos foram realizados numa célula com a configuração clássica de três eléctrodos. Um eléctrodo de referência saturado de calomelanos, um contra-electrodo de fio de platina e um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo.

Antes de cada utilização, a superfície dos eléctrodos de trabalho foi submetida a um procedimento de limpeza que consistiu no polimento com alumina de granulometria 0,3 $\mu$ m, lavagem sequencial com quantidades abundantes de dH<sub>2</sub>O e EtOH, imersão, num banho de ultra-sons durante 5 minutos, e secagem sob uma corrente de ar comprimido.

Todas as soluções de electrólito de suporte foram desarejadas com Argon, por borbulhamento, durante pelo menos 20 minutos, antes da realização dos ensaios.

Os trabalhos foram efectuados em dois electrólitos de suporte distintos: 100mM KCl em 50mM Tris- HCl, pH 7,6 e 100 mM KCl em 50 mM MES, pH 5,5. Os mediadores azul de bromofenol, viologénio de metilo, viologénio de benzilo, fenosafranina e vermelho neutro foram diluídos directamente nas soluções de electrólito, a uma concentração de 1 mM. O par mediador azul de Meldola / NADH foi também directamente diluído nas soluções tampão para uma concentração final de 0,5 mM / 2 mM respectivamente.

Nos estudos de interacção entre os mediadores e o substrato ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), o eléctrodo de trabalho foi mergulhado no electrólito de suporte imediatamente após o procedimento de limpeza. Nos ensaios onde foi utilizada a enzima, o GCE foi preparado por aplicação directa de uma gota de solução de Dsv, correspondente a 375 pmol de proteína, na superfície do eléctrodo, sendo esta imediatamente coberta por uma membrana de diálise, suportada por um o-ring, de acordo com o esquema apresentado na figura II.14.



**Fig. II.14:** Esquema de montagem do eléctrodo de trabalho para os ensaios com Desulfoviridina.

Os ensaios electroquímicos foram realizados por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de  $20 \text{ mVs}^{-1}$  (excepto indicação em contrário), sendo os varrimentos efectuados em janelas de potencial adaptadas ao sinal produzido pela redução reversível de cada um dos mediadores avaliados.

## II.3.4 – Aplicações Bioinformáticas

### II.3.4.1 – Caracterização Bioquímica

Os valores teóricos para as massas moleculares e para a absortividade molar a 280 nm das três subunidades da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi calculado por submissão das sequências de resíduos de aminoácidos correspondentes (Lucas *et al.*, 2009) aos programas *Compute pI/Mw* e *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005) respectivamente, ambos disponíveis no *Website ExPasy* (*Swiss Institute of Bioinformatics*).

A proporção relativa entre as subunidades da enzima foi determinada por análise densiométrica realizada através do *software* Kodak 1D 3,6.

### II.3.4.2 – Estruturas

#### II.3.4.2.1 – Determinação da Estrutura Primária

O alinhamento das sequências genéticas respeitantes à codificação das três subunidades da Dsv provenientes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio desulfuricans* G20 e *Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6 foi realizado através do *software* de alinhamento de múltiplas sequências ClustalW (1.81). O processamento dos resultados obtidos foi efectuado com recurso aos seguintes programas informáticos: reverso complementar dos fragmentos *backward* pelo *Reverse Complement*, alinhamento das sequências *forward* e *backward* através do ClustalW e tradução da sequência genética pelo *Translate tool* disponível no *Website ExPasy*.

A avaliação da sequência de resíduos de aminoácidos foi realizada por comparação com as sequências traduzidas das sequências genéticas da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Lucas *et al.*, 2009; UniProtKB/Swiss-Prot – B8J4R0/ B8IZA0/ B8J2P4), *D. vulgaris* Hildenborough (Heidelberg *et al.*, 2004; UniProtKB/Swiss-Prot – P45574/P45575/P45573), *D. desulfuricans* G20 (Copeland *et al.*, 2005; UniProtKB/Swiss-Prot – Q315R9/Q315R8/Q314T3), e *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997; UniProtKB/Swiss-Prot – Q59109/Q59110/O28055). Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa ClustalW2 (1.83).

#### II.3.4.2.2 – Previsão das Estruturas Terciária e Quaternária

A simulação da estrutura tridimensional das três subunidades da Dsv de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 foi realizada através de modelação por homologia recorrendo ao *Automatic Modelling Mode* do SwissModel (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006). A estrutura eleita pelo *software* como *template* pertence à Dsv de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Oliveira *et al.*, 2008), depositada no *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB) - *Protein Data Bank* (PDB) com o código **2V4J**.

Uma vez obtidas as estruturas simuladas de cada subunidade individualmente, realizou-se a simulação da estrutura do trímero em dois passos consecutivos. Em primeiro lugar procedeu-se ao acoplamento (*docking*) das subunidades  $\alpha$  (receptor) e  $\beta$  (ligando) com o *software* Patchdock (Duhovny *et al.*, 2002; Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005A), um algoritmo de acoplamento molecular baseado em princípios de complementaridade de forma.

Seguidamente, as 10 melhores soluções para o acoplamento foram refinadas através do FireDock (*Fast Interaction Refinement in Molecular Docking*) (Andrusier *et al.*, 2007; Mashiah *et al.*, 2008) e seleccionou-se a solução com a pontuação mais elevada para prosseguir com a simulação.

Repetiu-se o procedimento de acoplamento, desta vez com a solução anteriormente encontrada (correspondente ao dímero  $\alpha\beta$ ) a operar como receptor e a subunidade  $\gamma$  na função de ligando, seguido do refinamento das soluções obtidas. Igualmente, a solução com maior pontuação (correspondente ao trímero  $\alpha\beta\gamma$ ) foi apurada para avançar na simulação.

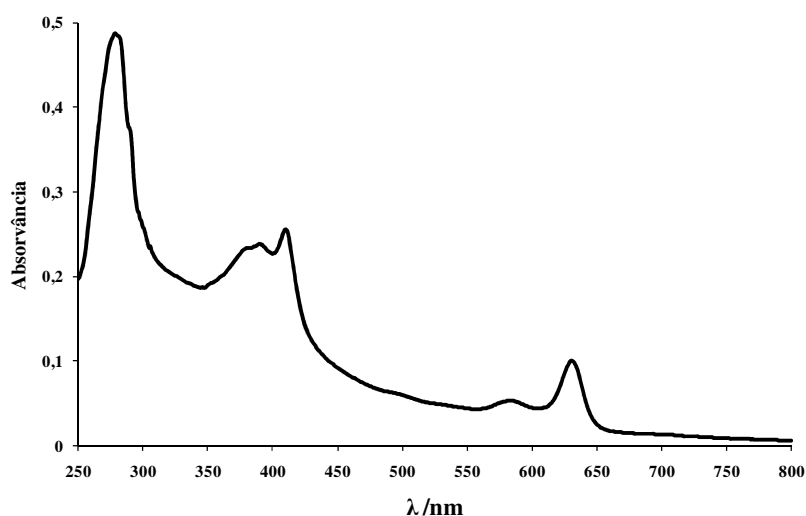
O último passo da simulação consistiu na construção da forma dimérica da Dsv. Para esse efeito submeteu-se a estrutura obtida anteriormente ao *software* SymmDock (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005A, 2005B), que prevê estruturas de complexos com simetria  $C_n$  (neste caso aplicou-se a restrição  $n=2$ ) através de acoplamentos baseados em parâmetros geométricos.



## II.4 – Resultados e Discussão

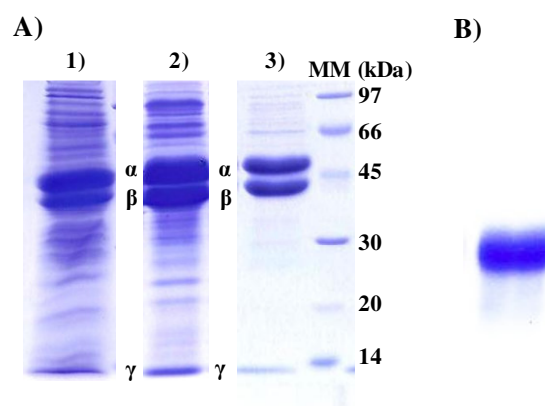
### II.4.1 – Purificação da redutase do sulfito dissimilativa Desulfoviridina

As adaptações do procedimento de purificação da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 conduziram à obtenção da proteína nativa com um grau de pureza bastante elevado, tal como o comprovam o espectro de absorção UV/Vis (fig. II.15) e os geis desnaturante (fig. II.16A, linha 3) e nativo (fig. II.16 B) da fracção final.



**Fig. II.15:** Espectro de absorção UV/Vis obtido com 1,5  $\mu\text{M}$  de Dsv de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

O espectro de absorção da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774, no estado nativo, apresenta máximos de absorção a 280, 390, 408, 580 e 630 nm, em concordância com os espectros publicados para a desulfoviridina purificada de *D. gigas* e *D. vulgaris* (Lee *et al.*, 1971, 1973; Lui *et al.*, 1994). A razão de pureza ( $\text{RP} = A_{280\text{nm}}/A_{630\text{nm}} = 4,8$ ) da fracção final foi inferior à obtida por Moura *et al.* (1988) na purificação da proteína de *D. gigas* (RP4,0). Contudo, após observação dos perfis electroforéticos em condições desnaturantes (fig. II.16A) e nativas (fig. II.16B) das fracções finais, concluiu-se que a proteína se encontrava suficientemente pura para prosseguir o trabalho.



**Fig. II.16:** Linhas de géis, corados com Azul de Coomassie, resultantes da aplicação de PAGE às fracções de desulfovibridina. A) Linhas de géis desnaturantes correspondentes a: 1) fracção eluída da coluna DE-52; 2) fracção eluída da coluna Source -15Q; 3) fracção final, eluída da coluna Superdex 200. B) Linha de gel nativo correspondente à fracção final.

As bandas referentes às três subunidades da Dsv foram transferidas para uma membrana de PVDF por transferência electroforética, tendo sido realizada a sequenciação química do N-terminal de cada uma. Os resultados foram então comparados com as sequências de Dsv de outras espécies de *Desulfovibrio*, nomeadamente *D. gigas* ATCC 19364 (Hipp & Trueper, 1996 (não publicado); UniProtKB/Swiss-Prot – P94694), *D. vulgaris* Hildenborough (Heidelberg *et al.*, 2004; UniProtKB/Swiss-Prot – P45573/P45574/P45575) e *D. desulfuricans* Essex 6 (Morse *et al.*, 2000) de forma a confirmar a identidade da proteína purificada. Os resultados obtidos neste procedimento encontram-se descritos na tabela II.5.

**Tabela II.5:** Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos correspondentes ao N-terminal de cada subunidade da Dsv de diferentes espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*.

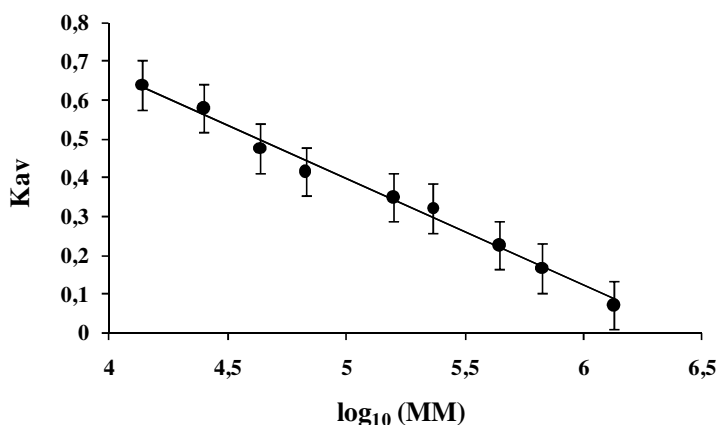
Sub - unidade	Sequência	Organismo
$\alpha$	AKHATPKLDQ LESGPWPSFV	<i>D. vulgaris</i>
	AKHATPLLDQ LESGPWPSFV	<i>D. desulfuricans</i> Essex 6
	AKHATPLLDQ LE?GPVPNFV	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774
$\beta$	AKHATPKLDQ LESGPWPSFV	<i>D. vulgaris</i>
	AFISSGYNPA KPMENRITDI	<i>D. gigas</i>
	AFISSGYNPA KPMEGRITDI	<i>D. desulfuricans</i> Essex 6
	AFISKGINPA KPMEGRKTD?	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774
$\gamma$	AEVTYKGKSF EVDEDEGFLLR	<i>D. vulgaris</i>
	AEKTYAG?QI EVDEDEGILLR	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774

Tendo em conta o elevado grau de similaridade encontrado entre as sequências em comparação, é possível concluir que a proteína purificada é, efectivamente, a desulfovibridina. Determinou-se ainda que a proteína contém as três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).

## II.4.2 – Caracterização Bioquímica

### II.4.2.1 – Massa Molecular

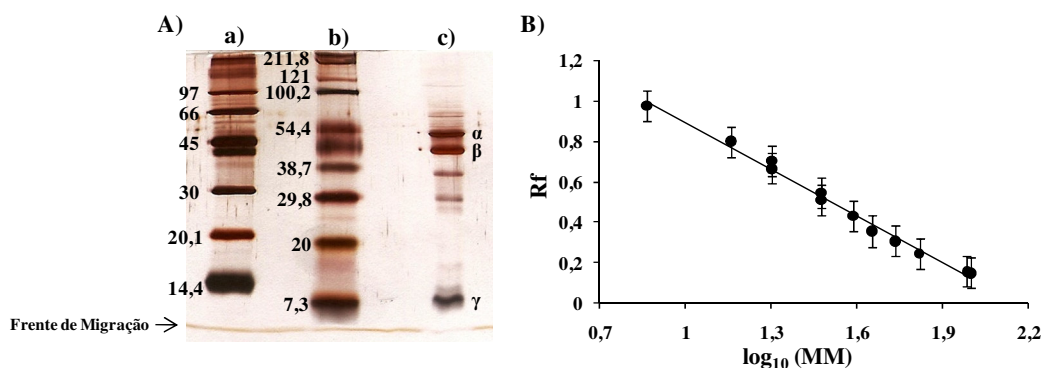
A determinação da massa molecular (MM) da Dsv nativa foi realizada por cromatografia de filtração em gel, após três ensaios cromatográficos, através da recta de calibração apresentada na figura II.17.



**Fig. II.17:** Recta de calibração para a determinação da massa molecular da Dsv nativa. Os resultados foram obtidos numa coluna pré-empacotada Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com 100 mM NaCl em 50 mM tampão Tris-HCl pH 7,6 (também utilizado como eluente) com um fluxo de 0,5 ml/min. Os pontos representados resultam do cálculo do valor médio do Kav de cada proteína padrão, em função do logaritmo da sua massa molecular. A recta apresenta um declive de -0,2763, uma ordenada na origem de 1,7782 e um coeficiente de correlação de 0,9906. As barras de erro representam o desvio padrão.

A massa molecular da desulfoviridina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, no estado nativo, assim estabelecida, é de  $209 \pm 3$  kDa, para um intervalo de confiança de 95%.

Não tendo sido possível proceder à desnaturação da proteína de forma a determinar a massa molecular das subunidades por métodos cromatográficos, estas foram determinadas por electroforese desnaturante, a partir de géis cujos resultados se encontram na figura II.18A.



**Fig. II.18:** Determinação da massa molecular das subunidades da Dsv. **A)** Gel SDS-PAGE a 12,5% corado com nitrato de prata. Linhas a) e b): marcadores de massa molecular. Linha c): Dsv. **B)** Recta de calibração. Os pontos representados resultam do cálculo do valor médio do  $R_f$  de cada proteína padrão, em função do logaritmo da sua massa molecular. A recta apresenta um declive de -0,7701, ordenada na origem de 1,6656 e coeficiente de correlação 0,9911. As barras de erro representam o desvio padrão.

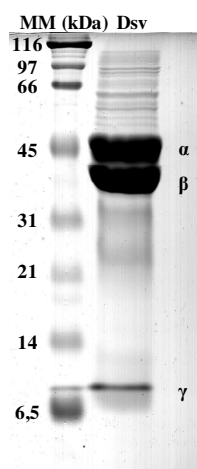
A massa molecular das subunidades da Dsv, determinada para um intervalo de confiança de 95%, assim como a validação dos resultados obtidos por comparação com os valores teóricos calculados com base na sequência de resíduos de aminoácidos da proteína de *D. desulfuricans* ATCC 27774, encontram-se registados na tabela II.6. Concluiu-se assim que as massas moleculares determinadas se encontram muito próximas dos valores calculados com base na sequência de resíduos de aminoácidos, apresentando somente uma ligeira “sobre-estimação” nas subunidades de maiores dimensões, para a qual poderá ter contribuído a presença dos co-factores, que não se encontra contabilizada na determinação teórica.

**Tabela II.6:** Massa molecular da desulfovirdina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Subunidade	Valores Experimentais (kDa)	Valores Teóricos (kDa)
<b>Proteína Nativa</b>	$209 \pm 3$	-----
$\alpha$	$51 \pm 2$	49,162
$\beta$	$44 \pm 2$	42,550
$\gamma$	$11 \pm 2$	11,923
<b>Multímero (<math>\alpha_2\beta_2\gamma_2</math>)</b>	$212 \pm 2$	207,27

A elevada sensibilidade da coloração com nitrato de prata permitiu visualizar duas bandas entre os 30 e 40 kDa, cuja presença não foi possível detectar nos géis corados com Azul de Coomassie. Atendendo à sua natureza vestigial, não foi possível a identificação dos contaminantes responsáveis pelo aparecimento destas bandas. A curva de calibração, a partir da qual os resultados foram adquiridos encontra-se apresentada na figura II.18B).

A confirmação da proporção relativa entre as subunidades da enzima foi obtida a partir da análise densiométrica das bandas do gel desnaturante cuja imagem se encontra na figura II.19. Na tabela II.7 encontra-se uma síntese dos resultados obtidos.



**Fig. II.19:** Determinação da proporção relativa entre as subunidades da desulfoviridina. Imagem digitalizada do gel desnaturante (12,5%), corado com azul de Coomassie.

**Tabela II.7:** Proporção relativa entre as subunidades da desulfoviridina. Massas Moleculares (MM), Intensidade Relativa (IR) e razão IR/MM das três subunidades da desulfoviridina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Sub - unidade	IR	IR/MM
$\alpha$	0,4442	$8,7 \times 10^{-3}$
$\beta$	0,4623	$10,5 \times 10^{-3}$
$\gamma$	0,0935	$8,5 \times 10^{-3}$

Tal como era esperado, as razões IR/MM para as três subunidades são muito semelhantes. Assim, o cálculo das diferentes combinações entre estas razões ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha/\gamma$ ,  $\beta/\gamma$ ) tende para 1, confirmando a proporção 1:1:1 admitida *a priori*. Considerando a MM da proteína nativa previamente determinada, conclui-se que a desulfovirdina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 nativa é constituída por um dímero de trimeros, com a configuração  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ .

#### II.4.2.2 – Determinação da Absortividade Molar

Conhecida a composição em subunidades da Dsv, assim como a massa molecular das mesmas, procedeu-se à determinação da absortividade molar ( $\epsilon$ ) da proteína.

A aplicação do método do BCA resultou numa concentração de proteína de  $4,5 \pm 0,3 \text{ mgml}^{-1}$ , a que corresponde  $22 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$ . A concentração determinada pelo método de Lowry foi  $4,3 \pm 0,5 \text{ mgml}^{-1}$ , a que corresponde  $21 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$ . Dado que ambos os métodos produziram resultados semelhantes, assumiu-se como correcto o valor contendo o menor erro associado, ou seja,  $22 \text{ }\mu\text{M}$ .

Uma vez conhecida a concentração molar, procedeu-se ao cálculo dos valores de  $\epsilon$  para a proteína nativa, tendo-se realizado igualmente o cálculo da absortividade molar a 280 nm por via computacional, com recurso ao software *ProtParam*. Na tabela II.8 apresentam-se os valores calculados.

**Tabela II.8:** Picos de absorção do espectro UV/Vis e absortividade molar da desulfovirdina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

$\lambda \text{ (nm)}$	$\epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$
280 (teórico)	334260
280	330682
390	162955
408	170454
580	36136
360	68864

Comparando os valores de  $\epsilon_{280\text{nm}}$  calculado a partir dos resultados experimentais com o obtido a partir da sequência de resíduos de aminoácidos, constata-se que estes são bastante semelhantes, sobretudo tendo em conta que o algoritmo de cálculo assume que a proteína se encontra dissolvida em água e que todas as cisteínas se encontram “emparelhadas” por ligações persulfureto, o que na realidade não acontece. Esta semelhança vem reforçar a validação da quantificação realizada pelos dois métodos espectrofotométricos.

### II.4.2.3 – Co-Factores

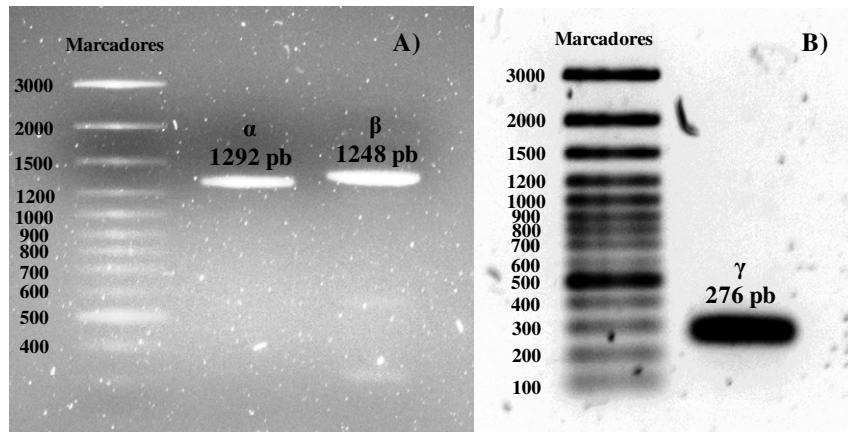
A quantidade de ferro total presente na Dsv foi estimada em  $17 \pm 4$  átomos de Fe por molécula de proteína e a determinação do teor em ferro lábil resultou em  $17 \pm 2$  átomos de Fe por molécula de Dsv. Estes resultados são concordantes com dados anteriores, cuja interpretação indicou a presença de dois sirohemos, dos quais cerca de 80% na forma de sirohidroclorina, e quatro centros [4Fe4S] por molécula, tal como foi descrito para as proteínas de *D. gigas* (Moura *et al.*, 1988), *D. desulfuricans* Essex 6 (Steuber *et al.*, 1995) e *D. vulgaris* (Marrit & Hagen, 1996).

A resolução da estrutura cristalina da desulfoviridina de *Desulfovibrio vulgaris* veio, contudo, provar que a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho (e trabalhos precedentes) não se encontrava correcta. A proteína deste organismo contém, na realidade, dois sirohemos, duas sirohidroclorinas e oito centros [4Fe4S], perfazendo um total de 34 átomos de ferro por molécula.

O facto de este valor corresponder a exactamente o dobro do que foi calculado neste trabalho, conduziu à suspeição da ocorrência de um erro grosseiro no cálculo da concentração de proteína utilizada na realização dos ensaios. Contudo, a quantificação de proteína, realizada pelo método do BCA, foi confirmada pelo método de Lowry e através de cálculo directo com base no espectro de absorção UV/Vis apresentado na figura II.15, sendo que os três métodos produziram resultados semelhantes. Uma outra hipótese consiste na perda de co-factores no decurso da purificação, facto que poderá igualmente explicar a fraca actividade anteriormente reportada para esta enzima. A forma de testar esta hipótese passaria pela resolução da estrutura tridimensional da proteína utilizada neste trabalho.

### II.4.3 – Sequências de Resíduos de Aminoácidos

A sequência de resíduos de aminoácidos da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi determinada através da conjugação dos dados obtidos por sequenciação química da proteína purificada (N-terminal e péptidos resultantes de digestão trípica) e sequenciação de ADN (fig. II.20), com posterior tradução. A conjugação das sequências obtidas através de cada uma destas técnicas conduziu à obtenção de 98,7% da sequência da proteína.



**Fig. II.20:** Fragmentos de ADN resultantes das reacções de PCR. Imagens de géis de agarose a 1%, contendo os produtos de PCR após purificação e corados com SyBr. A) Fragmentos de ADN que codificam as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Dsv. B) Fragmento de ADN que codifica a subunidade  $\gamma$  da desulfoviridina.

As sequências de resíduos de aminoácidos determinadas neste trabalho foram comparadas com as sequências depositadas por Lucas *et al.* (2009), as quais derivam da tradução do genoma da *D. desulfuricans* ATCC 27774. Simultaneamente realizou-se o alinhamento entre as sequências da proteína de *D. desulfuricans* ATCC 27774, *D. vulgaris* Hildenborough, *D. desulfuricans* G20 e *A. fulgidus*, através do programa ClustalW2 (versão 2.0.12), o qual é apresentado em seguida (fig. II.21).

#### Subunidade $\alpha$ :

```

D. desulfuricans 27774 (a)  -AKHATPLLDQLESGVPFSFVSDIKLEAAYR---PK-GLDYQIPVDCPEDLLGVLELSYN 55
D. desulfuricans 27774 (b)  MAKHATPLLDQLESGPWPFSFVSDIKLEAAYRAENPK-GLDYQIPVDCPEDLLGVLELSYN 59
D. desulfuricans G20        MAKHATPKLDQLESGPWPFSFVSDIKQEAEMRAKNPK-GLDYQIPVDCPEDLLGVLELSYN 59
D. vulgaris                 MAKHATPKLDQLESGPWPFSFVSDIKQEAAYRAANPK-GLDYQIPVDCPEDLLGVLELSYD 59
A. fulgidus                 --MSETPLLDLEKGPWPFSFVKEIKKTAELMEKAAAECKDVKMEKG-ARGLLKQLEISYK 57
                        ** **:*:* ** **:*:* ** **:*:* ** **:*:* ** **:*:* ** **:*:*

D. desulfuricans 27774 (a)  DKETHWKHGGIVGVFGYGGGVIGRYCDQPEMFPGVAHFHTMRVAQPAKYVHSKFLRDLC 115
D. desulfuricans 27774 (b)  DKETHWKHGGIVGVFGYGGGVIGRYCDQPEMFPGVAHFHTMRVAQPAKYVHSKFLRDLC 119
D. desulfuricans G20        EGETHWKHGGIVGVFGYGGGVIGRYCDQPEMFPGVAHFHTVRVNOAGKFYTSEYLRKLC 119
D. vulgaris                 EGETHWKHGGIVGVFGYGGGVIGRYCDQPEMFPGVAHFHTVRVAQPSGKYYSADYLRKLC 119
A. fulgidus                 DKKTHWKHGGIVSVFGYGGGVIGRYSDLGEQIPEVEHFHTMRINQPSGWFYSTKALRLC 117
                        : :*****:******:* * :* * * * :* :* :* :* :* :*

D. desulfuricans 27774 (a)  DIWDLRGSGLTNMGSTGDIVLLGTQTAQLEEIFHELT-HKMNVDLGGSGSNLRTPEACL 174
D. desulfuricans 27774 (b)  DIWDLRGSGLTNMGSTGDIVLLGTQTAQLEEIFHELT-HKMNVDLGGSGSNLRTPEACL 178
D. desulfuricans G20        DIWDLRGSGLTNMGSTGDIVLLGTTFQLEEIFWELT-HDLETDLGGSGSNLRTPEACL 178
D. vulgaris                 DIWDLRGSGLTNMGSTGDIVLLGTQTFQLEEIFELT-HNLNTDLGGSGSNLRTPEACL 178
A. fulgidus                 DVWEKWSGSLINFHGSTGDIIFLGT RSEYLPQCFEDLGNLEIPFIIGSGSGDLRTPEACL 177
                        *: * :*****:******:* : * : * :* :* :* :* :* :* :* :*

D. desulfuricans 27774 (a)  GQSRCEYACYNTQDMCYQLTMDYQDELHRPAFPYKFKFKFDGCPNGCVCAMARSDFAVVG 234
D. desulfuricans 27774 (b)  GQSRCEYACYNTQDMCYQLTMDYQDELHRPAFPYKFKFKFDGCPNGCVCAMARSDFAVVG 238
D. desulfuricans G20        GESRCEYACYDSQDMCYDLTQEQYQDELHRPAFPYKFKFKFDACPNCGVASIARSDFSVIG 238
D. vulgaris                 GKSRCEYACYDSQAACYELTMEYQDELHRPAFPYKFKFKFDACPNCGVASIARSDFSVIG 238
A. fulgidus                 GPALCEYACDITLCLCYDLTMTYQDELHRPMWPKFKIKCAGCPNDVASKARSDFAIIG 237
                        * : * :*****:******:* :*****:* :*****:* :*****:* :*****:*

```



### Subunidade $\beta$ :

135

### Subunidade $\gamma$ :

*D. desulfuricans* 27774 (a) -AEKTYAG-QI-EVDEGGFLRLRFDWCPEWMDVYKSEGIS----EITADHQKILDFLDQY 54  
*D. desulfuricans* 27774 (b) MAEITVYKGGKSFVEDEGGFLRLRFDWCPEWMDVYKSEGIS----EITADHQKILDFLDQY 56  
*D. desulfuricans* G20 MAEVSFGKGTFEVDEDEGGFLRLRFDWCPEWVEYKSESGIA--EITEDHQKIIDFLDQY 56  
*D. vulgaris* MAEVTYKGGKSFVEDEGGFLRLRFDWCPEWVEYKSEGIS----DISPDHQKIIDFLDQY 56  
*A. fulgidus* MPELEVKGKKLRLDEDEGFLQDWEENDEEVAEALAKDTRFSPQIETEEHWKIRIYLRDY 60  
  
\* \* \* \* \* : : : \* \* : : : : : : : : : \* \* \* : \* : \* \*

*D. desulfuricans* 27774 (a) YKNGIAPMVRILSKN-----TG YKLKEVYELFPSPGPGKACKMAGLPKPT--- 100  
*D. desulfuricans* 27774 (b) YKNGIAPMVRILSKN-----TG YKLKEVYELFPSPGPGKACKMAGLPKPTGCV 105  
*D. desulfuricans* G20 YRKNGIAPMVRILSKN-----TGFKLKQVYELFPSPGPGKACKMAGLPKPTGCV 105  
*D. vulgaris* YKNGIAPMVRILSKN-----TGFKLKKEVYELFPSPGPGKACKMAGLPKPTGCV 105  
*A. fulgidus* FTKYGVAPVRLMLVHKCKEVRPDCLQYIYKLFPGQAKDACRTAGLPKPTGCV 115  
  
\* \* \* \* \* : : : \* \* \* \* \* : : : \* \* \* \* \* : : : \* \* \* \* \*

**Fig. II.21:** Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das três subunidades da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 ((a) - obtidas neste trabalho; (b) - depositadas por Lucas *et al.* (2009)), *D. desulfuricans* G20, *D. vulgaris* Hildenborough e *A. fulgidus*. Os resíduos de aa envolvidos na ligação aos centros [4Fe4S] encontram-se assinalados a verde. As zonas de identidade entre as quatro proteínas apresentam-se destacadas a lilás, a azul encontra-se o acréscimo relativo às zonas onde as desulfoviridinas das três espécies de *Desulfovibrio* são idênticas e a amarelo representa-se o suplemento referente à identidade entre as sequências determinada e depositada da enzima de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Os alinhamentos de sequências acima representados comprovam que a sequenciação genética da desulfoviridina foi bem sucedida, sendo que as poucas discrepâncias encontradas se localizam em regiões onde só foi possível determinar a sequência por via química.

Com base nos alinhamentos da figura II.21 foram calculados, em termos de percentagem, os graus de identidade e homologia entre a sequência de resíduos de aminoácidos da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e as desulfoviridinas dos restantes três organismos. Apresentam-se na tabela II.9 os resultados numéricos assim adquiridos.

**Tabela II.9:** Grau de identidade (Ident.) e similaridade (Simil.), calculados em termos de percentagem, encontrados entre a sequência de resíduos de aa da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e as sequências das restantes proteínas.

<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	<i>D. desulfuricans</i> G20		<i>D. vulgaris</i> Hildenborough		<i>A. fulgidus</i>	
Subunidade	Ident.	Simil.	Ident.	Simil.	Ident.	Simil.
$\alpha$	81,2	95,2	84,2	96,3	54,7	79,8
$\beta$	86,1	96,1	86,4	97,6	56,5	80,6
$\gamma$	86,7	99,1	92,4	100,00	45,5	76,4

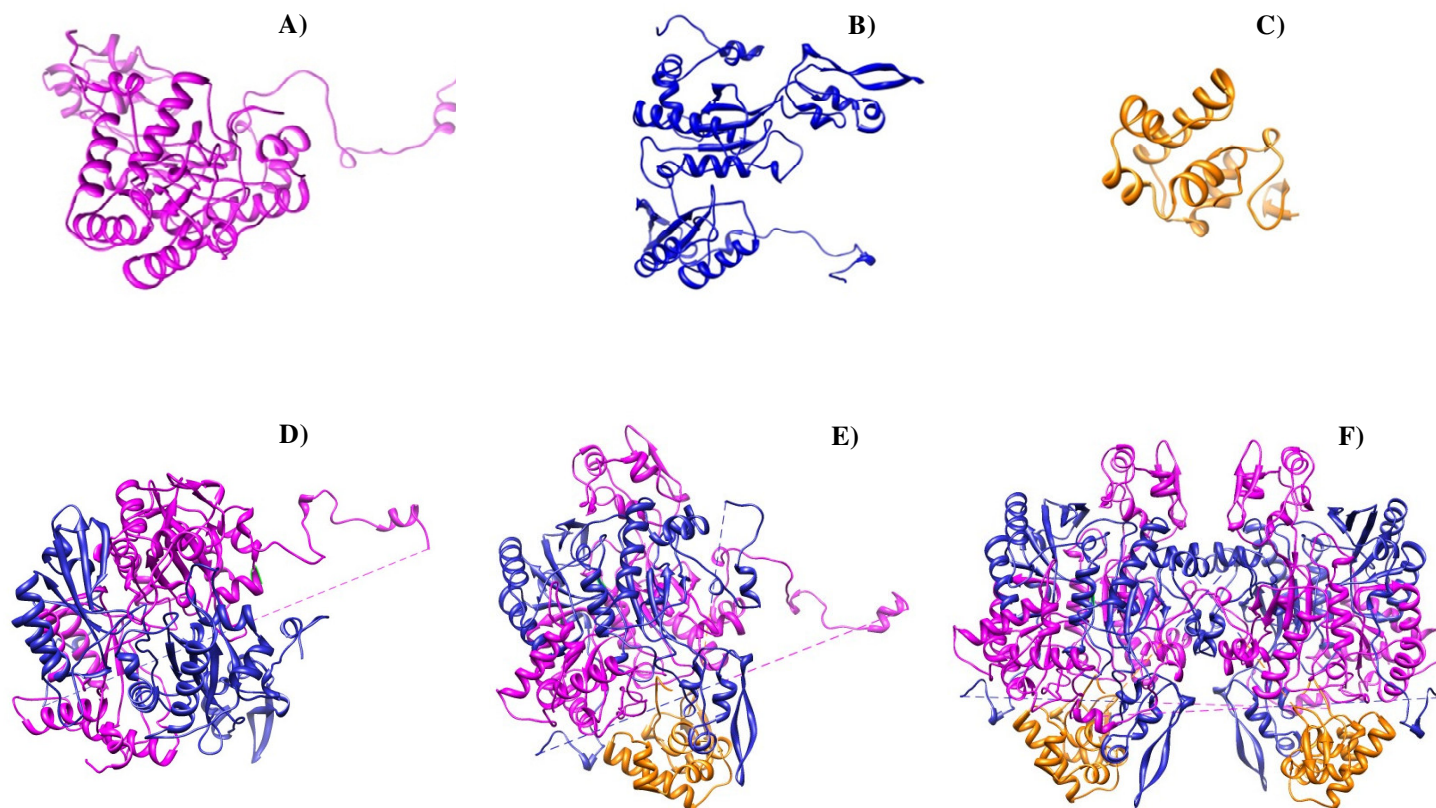
De uma forma geral, as proteínas provenientes dos organismos pertencentes ao género *Desulfovibrio* apresentam um elevado grau de identidade entre si (> 80%). Até mesmo em relação à enzima da *A. fulgidus* observou-se a existência de um grau de similaridade superior a 70%, não obstante, esta proteína ter sido, até ao momento, purificada somente sob a forma de um tetrâmero de configuração  $\alpha_2\beta_2$  (Schiffer *et al.*, 2008). Estas observações são concordantes com o elevado nível de conservação existente nos genes *dsvAB* (Stahl *et al.*, 2002 e referências nele incluídas). Salienta-se ainda a existência de um maior grau de similaridade entre a proteína de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e a Dsv de *D. vulgaris* Hildenborough do que entre as enzimas pertencentes à mesma espécie (estirpes diferentes) de *Desulfovibrio*. Mais, observa-se inclusivamente que o motivo de ligação ao centro  $[4Fe4S](2)$  da subunidade  $\alpha$  é exactamente o mesmo nas duas sequências, ao passo que a sequência da Dsv de G20 não possui a Cys<sub>288</sub>, sendo viável que a ligação ao átomo de Fe seja realizada através da Cys<sub>303</sub>, em conformidade com o que ocorre na proteína de *A. fulgidus*.

Um outro aspecto interessante é o elevado grau de similaridade encontrado na zona do C-terminal da subunidade  $\gamma$  das quatro proteínas. Oliveira *et al.* (2008) propõem um mecanismo de redução do sulfito que contempla o envolvimento directo desta subunidade da Dsv. Contudo, essa assumpção é posta em causa quando se sabe que a proteína de *A. fulgidus*, possui o gene que codifica a subunidade  $\gamma$  (traduzindo-se este numa sequência de resíduos de aminoácidos idêntica a nível do C-terminal à verificada nas proteínas de *Desulfovibrio*), mas essa subunidade não é expressa e a enzima é activa na configuração  $\alpha_2\beta_2$ .

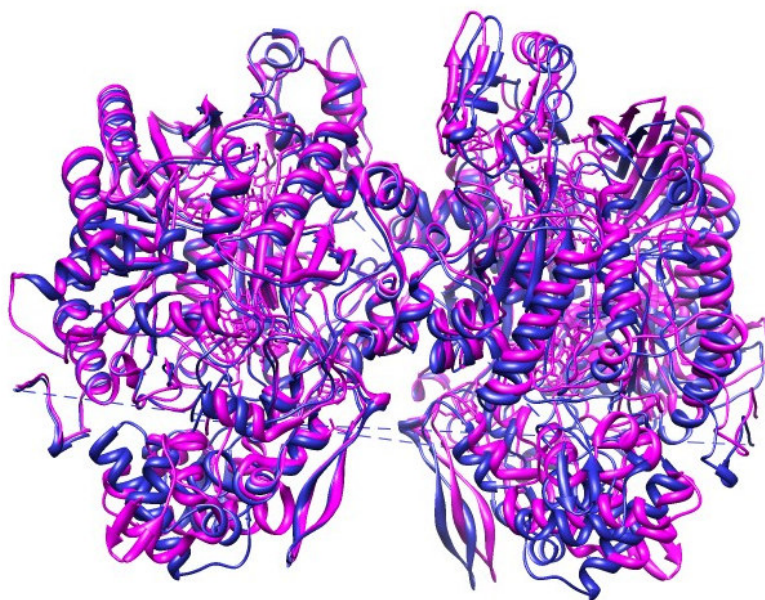
#### II.4.4 – Previsão das Estruturas Terciária e Quaternária

Os resultados alcançados nas diferentes etapas que conduziram à produção de um modelo para a estrutura tridimensional da Dsv de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 encontram-se representados na figura II.22.

A sobreposição entre a estrutura obtida através da simulação e a estrutura da proteína de *D. vulgaris* Hildenborough que lhe serviu de modelo (fig. II.8) encontra-se representada na figura II.23.



**Fig. II.22:** Construção do modelo para a estrutura tridimensional da Dsv de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Estruturas das subunidades adquiridas através do SwissModel: **A)** subunidade  $\alpha$  (identidade estrutural de 83,7%), **B)** subunidade  $\beta$  (identidade estrutural de 85,5%), **C)** subunidade  $\gamma$  (identidade estrutural de 92,2%). Estruturas adquiridas por acoplamento das subunidades recorrendo ao Patchdock, com posterior refinamento no FireDock: **D)** dímero  $\alpha\beta$ , **E)** trímero  $\alpha\beta\gamma$ . **F)** Modelo final da estrutura da proteína (configuração  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ , sem co-factores) construída por modelação no SymmDock. As imagens apresentadas foram processadas com o *software UCSF Chimera*.



**Fig. II.23:** Sobreposição da estrutura conseguida por modelação (azul) com a estrutura que lhe serviu de modelo (rosa), a desulfovibridina de *D. vulgaris* Hildenborough.

A comparação entre a estrutura facultada através de simulação com a estrutura da proteína modelo (fig. II.23) permite verificar que existe um elevado grau de semelhança entre elas. Este resultado está de acordo com o previsto atendendo aos elevados graus de identidade das sequências de resíduos de aminoácidos (tabela II.9). Foram contudo, detectadas duas diferenças relevantes. A primeira consiste numa ligeira rotação de um trímero  $\alpha\beta\gamma$  em relação ao outro. Esse rearranjo da estrutura face à proteína modelo poderá dever-se à forma como foi efectuada a construção do dímero. Com efeito, o algoritmo de previsão utilizado baseia o acoplamento dos dois trómeros em parâmetros geométricos, assumindo a existência de um eixo de simetria entre eles. Ao analisar-se a estrutura da proteína modelo verifica-se que, na realidade, esse eixo não existe, ocorrendo sim uma aproximação entre as subunidades  $\alpha$ , acompanhado de um afastamento entre as subunidades  $\beta$ . Possivelmente, o recurso a um *software* que contemple também interacções de natureza electrostática resultará num modelo mais adequado. A segunda diferença relaciona-se com a ligação da subunidade  $\gamma$  ao complexo  $\alpha\beta$ . Na Dsv simulada, a subunidade  $\gamma$  é alvo de uma rotação que a aproxima da subunidade  $\beta$ . Uma vez mais, alerta-se para o facto de o algoritmo de modelação se basear, neste caso, em princípios de complementaridade de forma, não considerando as interacções de natureza electrostática ou outras.

Realça-se ainda que a natureza da ligação entre as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  foi um dos aspectos mais surpreendentes descobertos com a resolução da estrutura cristalográfica da Dsv de *D. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2008). Os autores propõem que a proximidade detectada entre o N-terminal da subunidade  $\gamma$  e o sirohemio da subunidade  $\beta$  implica o envolvimento da subunidade  $\gamma$  no processo catalítico. Mas, tal como descrito anteriormente na secção II.2.2.3.2, existe uma ligação covalente S-C entre a última cisteína do N-terminal da subunidade  $\gamma$  e o sirohemio da subunidade  $\beta$  que contraria a proposta apresentada. O tema continua, assim, aberto a discussão.

#### II.4.5 – Electroquímica

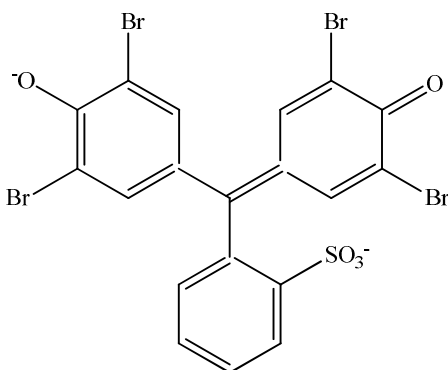
Atendendo à baixa actividade enzimática da Dsv e ao facto de os sirohemos se encontrarem fortemente embebidos na estrutura proteica, com uma distância mínima para a superfície de  $\approx 14 \text{ \AA}$  (Oliveira *et al.*, 2008), era espectável que as tentativas para obter um sinal resultante da interacção directa entre a proteína e um eléctrodo de trabalho não conduzissem a resultados satisfatórios. Não obstante, foram realizados ensaios de voltametria cíclica com o objectivo de atingir correntes catalíticas *via* electroquímica directa da desulfovirdina em diferentes materiais de eléctrodo (GC, PG plano *edge* e plano basal polido e Au) e condições experimentais, entre as quais se destacam a composição do electrólito de suporte ( $5 < \text{pH} < 8$ ;  $20 \text{ mM} < [\text{KCl}] < 200 \text{ mM}$ ), as janelas de potencial (compreendidas entre os 0,5 e os -0,9 V *vs* SCE) e as velocidades de varrimento (de 5 a  $250 \text{ mVs}^{-1}$ ), tendo sido ainda realizados alguns testes recorrendo à técnica de voltametria de onda quadrada. O insucesso de todas estas tentativas levou à procura de um mediador redox artificial passível de realizar as trocas electrónicas entre o eléctrodo de trabalho e a enzima. Assim, procedeu-se a uma série de ensaios com vista a determinar qual o mediador mais adequado à obtenção de correntes catalíticas que permitissem a construção de um biossensor específico para sulfitos, tendo a Dsv como elemento de reconhecimento biológico. Numa fase inicial, procedeu-se à realização de ensaios de controlo nos quais se pretendeu avaliar a reactividade dos mediadores face ao substrato, o qual apresenta um potencial de redução bastante baixo, conferindo-lhe um poder oxidante relativamente pronunciado. Nos casos em que os mediadores demonstraram ser inertes, deu-se continuidade ao trabalho, introduzindo a Dsv no sistema e avaliando a resposta deste à presença de sulfito.

Os ensaios cujos resultados se apresentam em seguida foram realizados ao pH fisiológico do organismo de onde a enzima provém (pH 7,6) e também a pH 5,5. O recurso a este valor de pH ácido decorreu de um compromisso entre dois factores. Por um lado foi considerado o pH usual (entre 3 e 4) a que as eventuais amostras reais se encontrariam (Beelman & Gallander, 1979) e, por outro lado, o valor de pH mínimo passível de não interferir significativamente com a actividade enzimática.

Na ausência de dados na literatura respeitantes à variação da actividade da Dsv com o pH, foi utilizado como referência o valor de pH óptimo (6,0) para a actividade da desulfofusicidina (Hatchikiam & Zeikus, 1983).

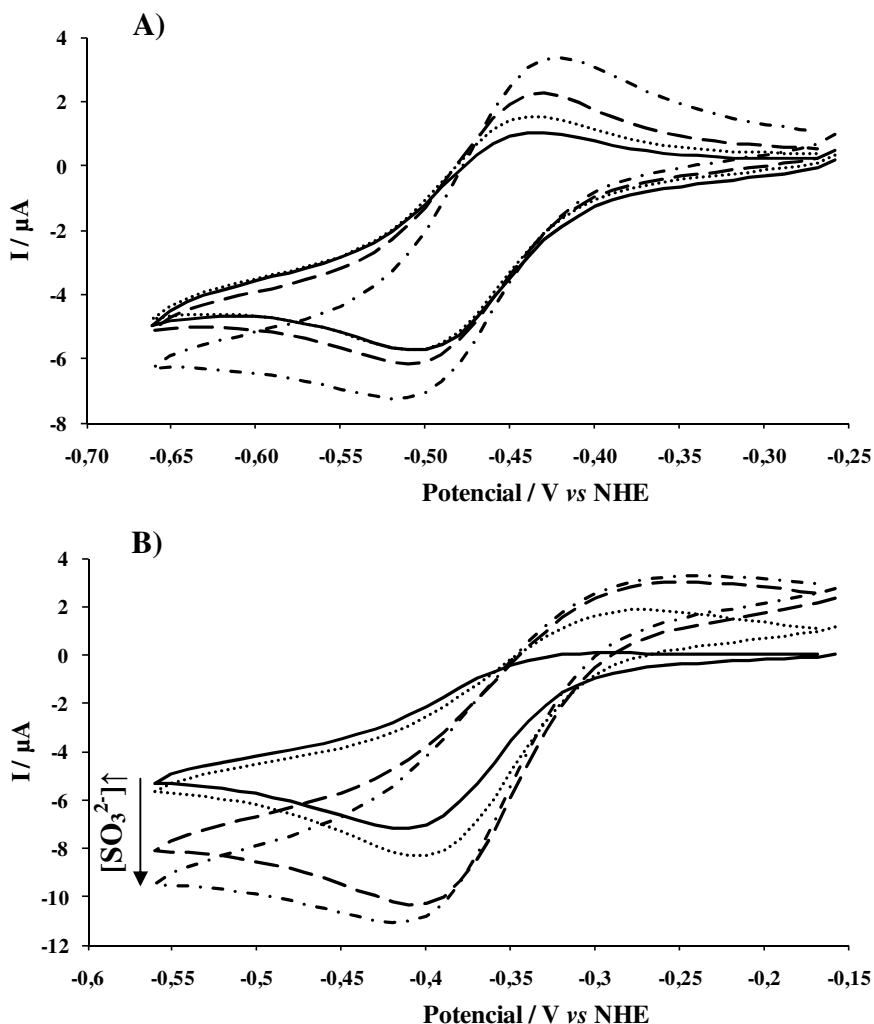
#### II.4.5.1 – Azul de Bromofenol

Importa salientar que o azul de bromofenol na sua forma neutra (ABH<sub>2</sub>), sofre uma dupla desprotonação em solução, para os valores de pH empregues neste trabalho (eq. 2.5 e 2.6). Assim, a estrutura do mediador presente em solução não é aquela apresentada na tabela II.4, mas sim a que consta da figura II.24 (Saikia *et al.*, 2003; Shapovalov *et al.*, 2005).



**Fig. II.24:** Estrutura da forma aniónica (AB<sup>2-</sup>) do azul de bromofenol, no estado oxidado, presente em solução para pH 7,6 e pH 5,5 (Saikia *et al.*, 2003; Shapovalov *et al.*, 2005).

Na figura II.25 encontram-se representados voltamogramas cíclicos obtidos com 1mM de AB dissolvido em ambos os electrólitos de suporte, na presença de diferentes concentrações de sulfito.



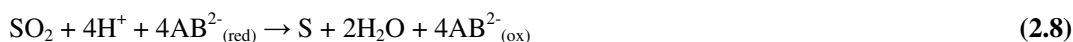
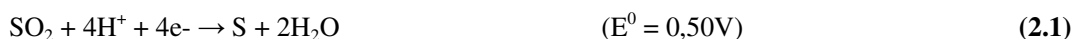
**Fig. II.25:** Ensaios realizados com azul de bromofenol e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (....) 1 mM, (---) 10 mM, (-.-) 20 mM. **A)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6. **B)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5.

Os voltamogramas traçados na presença de concentrações crescentes de  $\text{SO}_3^{2-}$  a pH 7,6 (fig. II.25A) apresentam um aumento generalizado da intensidade, quer dos sinais faradaicos, quer da corrente capacitiva, o qual pode advir do aumento de transportadores de carga no sistema. Assim, a evidente susceptibilidade do sistema à concentração salina do meio, torna-o inadequado à construção de um biossensor electroquímico específico para sulfito.

Os resultados apresentados na figura II.25B permitiram verificar a ocorrência de uma reacção química directa entre o mediador e o substrato a pH 5,5. Na secção II.2.1.1 foi discutida a predominância de diferentes espécies aniónica de enxofre em solução consoante o pH do meio e é este facto que poderá estar na base da dependência do pH observada.



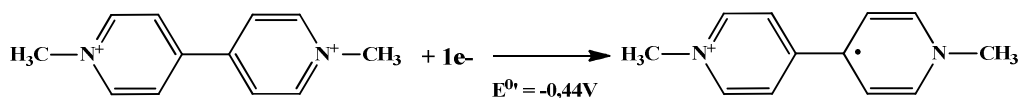
O primeiro aspecto a ter em consideração no que respeita aos voltamogramas traçados a pH 5,5 é a perda de reversibilidade na transferência electrónica entre o mediador e o eléctrodo. Ao adicionar-se sulfito ao meio observa-se um aumento da intensidade da corrente produzida no sentido da redução. Atendendo a que a espécie predominante a pH 5,5 não é o sulfito mas sim o SO<sub>2</sub>, indubitavelmente se conclui que o mediador é oxidado directamente pelo dióxido de enxofre (eq. 2.8), conduzindo à geração de sinais semelhantes aos normalmente encontrados quando existem correntes catalíticas.



#### II.4.5.2 – Viologénio de Metilo

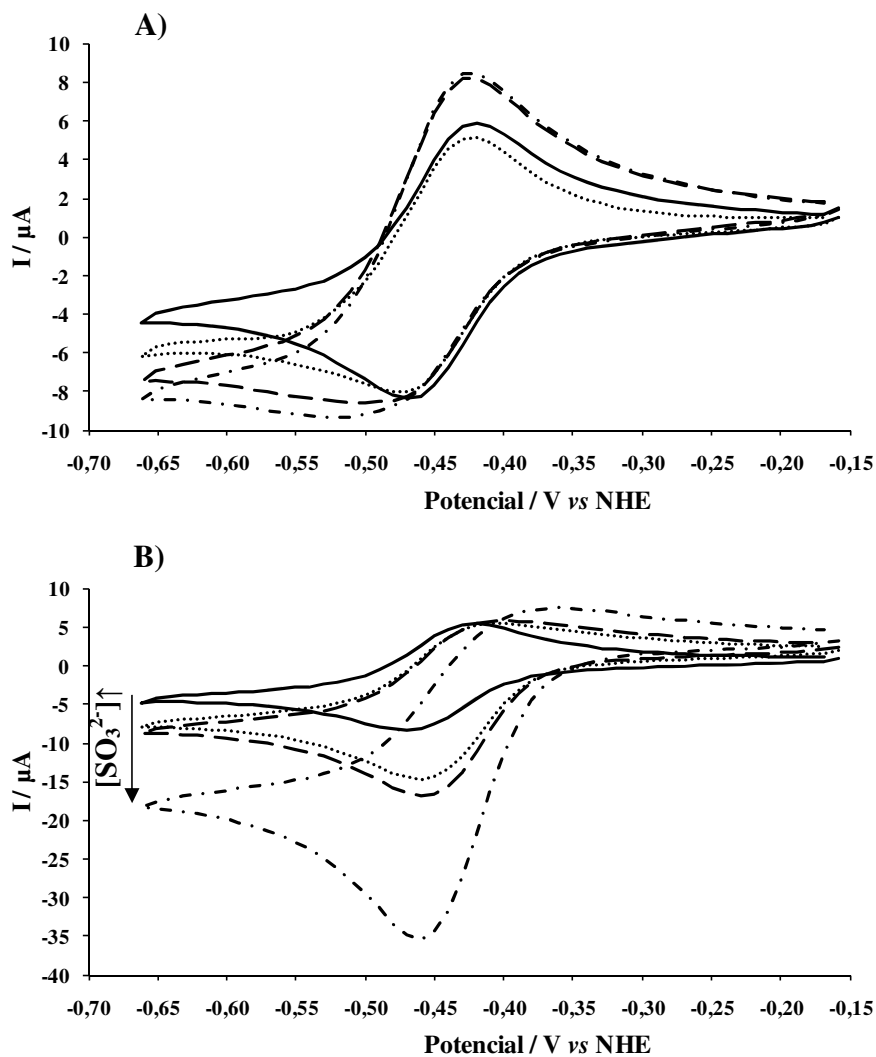
Os voltamogramas cíclicos traçados na presença de 1mM de viologénio de metilo (MV) e diferentes concentrações de sulfito (fig. II.27) apresentam formas muito semelhantes às verificadas com o azul de bromofenol e, como tal, assume-se que as causas para os comportamentos observados com o MV sejam idênticas às previamente apontadas para o AB.

Na figura II.26 apresenta-se a semi-equação de redução do MV<sup>2+</sup>. A conjugação desta semi-equação com a semi-equação 2.1 (para pH 5,5) resulta na equação global 2.9, a qual representa a reacção do MV com o dióxido de enxofre presente em solução a pH ácido.



**Fig. II.26:** Semi-equação para a primeira redução do MV<sup>2+</sup> (Makarov *et al.*, 2002).

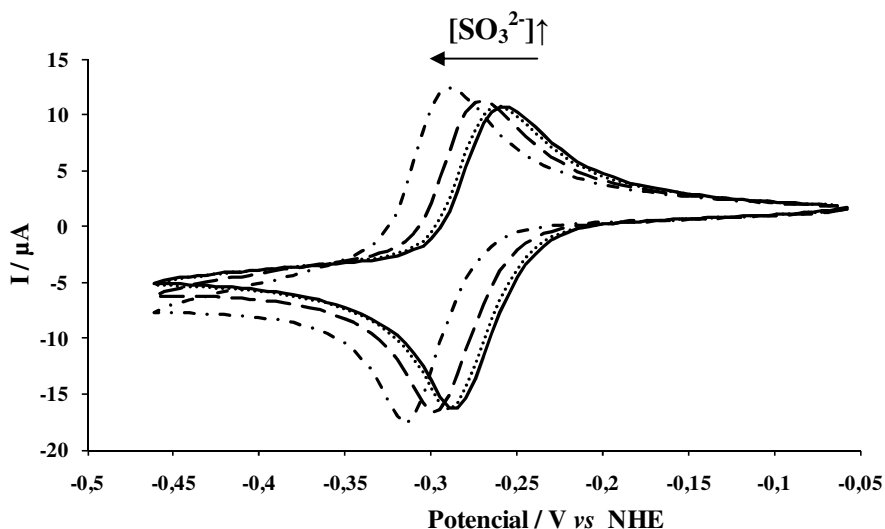




**Fig. II.27:** Ensaio realizado com viologénio de metilo e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (•••••) 1 mM, (---) 10 mM, (-•-) 20 mM. **A)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6. **B)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5.

### II.4.5.3 – Vermelho Neutro

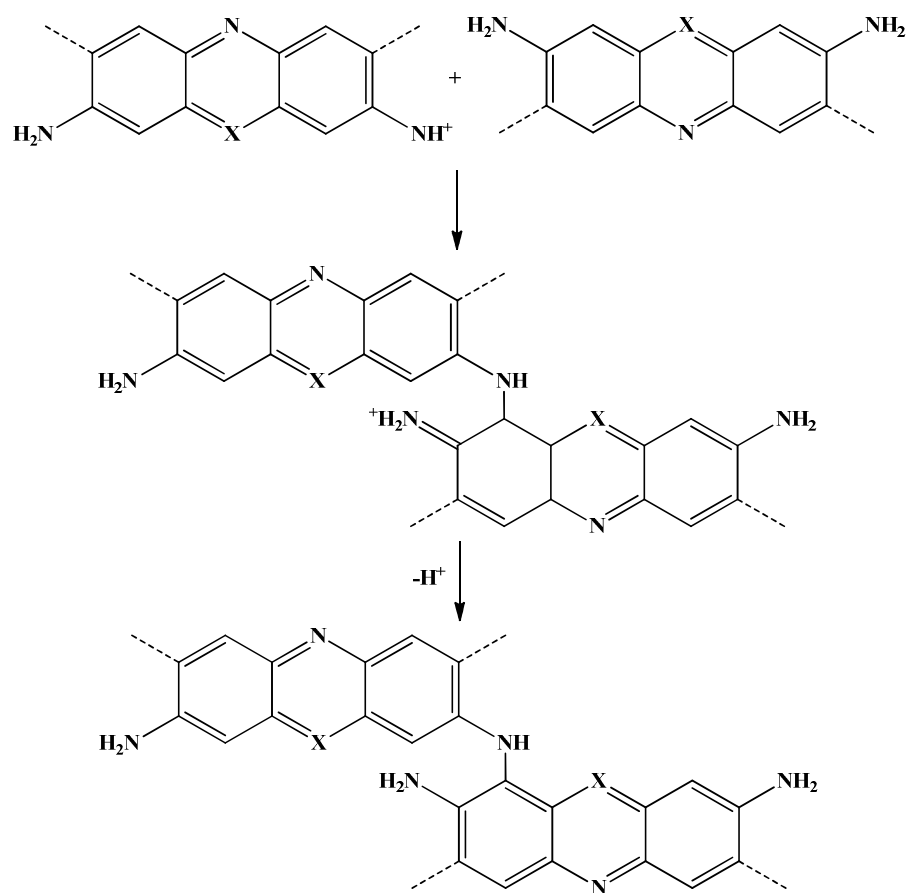
Na figura II.28 encontram-se representados voltamogramas cíclicos obtidos na presença de diferentes concentrações de sulfito com 1mM de vermelho neutro (VN), a pH 5,5. Não foi possível realizar ensaios com este mediador a pH 7,6 devido à sua insolubilidade no electrólito.



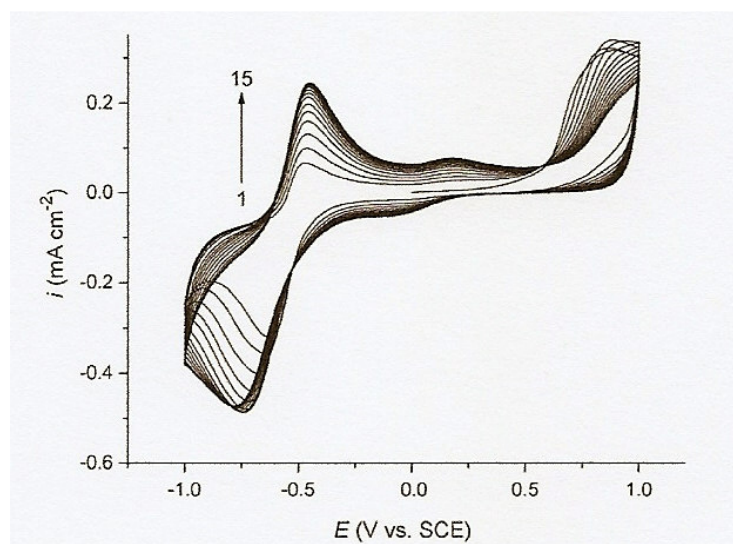
**Fig. II.28:** Ensaios realizados com vermelho neutro e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (.....) 1 mM, (---) 10 mM, (-.-) 20 mM. Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5.

Na presença de sulfito observa-se um desvio, no sentido negativo, do potencial de redução deste corante, associado a um ligeiro aumento da intensidade do sinal.

A utilização de fenazinas e polifenazinas em sensores e biosensores electroquímicos encontra-se amplamente divulgada, tendo sido tema de um recente artigo de revisão publicado por Paulinkaite *et al.* (2010). Estes autores sugerem o mecanismo de polimerização para os compostos desta família (fig. II.29) que, para o caso do VN pode ser obtido por via electroquímica, como se demonstra nos voltamogramas ciclicos da figura II.30.



**Fig. II.29:** Possível mecanismo da polimerização de azinas (Paulinkaite *et al.*, 2010).



**Fig. II.30:** Electropolimerização do VN a partir de uma solução contendo 1mM de VN num electrólito de suporte a pH 5,5 (Paulinkaite *et al.*, 2010).

O perfil voltamétrico observado no decurso dos ensaios com VN é surpreendentemente semelhante aquele que ocorre aquando da electropolimerização deste composto, levantando-se por isso, a hipótese de o dióxido de enxofre presente na solução actuar como agente oxidante, em substituição da oxidação electroquímica que ocorre quando os varrimentos são realizados até potenciais mais elevados. A validação de tal hipótese encontra-se, contudo para além dos objectivos traçados para este trabalho.

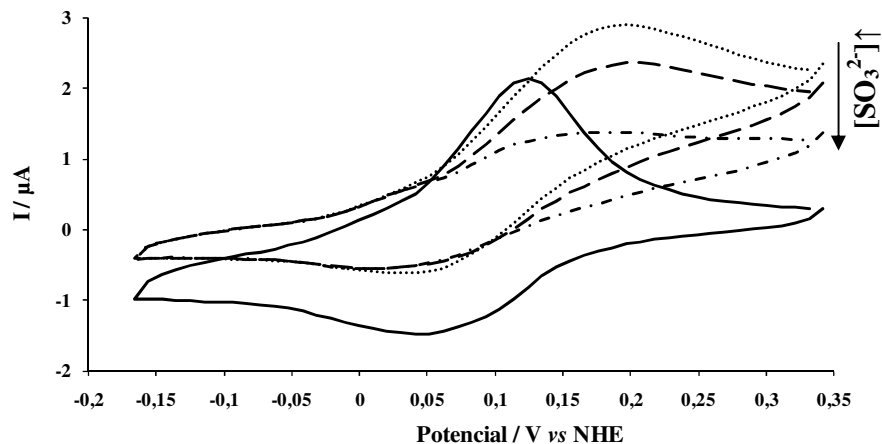
#### II.4.5.4 – Azul de Meldola / NADH

A utilização de azul de Meldola (AM), habitualmente associada à tecnologia de eléctrodos *screen-printed*, constituiu uma estratégia popular na construção de biossensores electroquímicos para a detecção de NADH (Vasilescu *et al.*, 2003; Tudorache & Bala, 2007) ou em alternativa, cujo elemento de reconhecimento biológico consiste em enzimas dependentes de NADH (Hart *et al.*, 1999; Avramescu *et al.*, 2001). Em ambos os casos este corante assume a função de mediador, reduzindo o sobrepotencial de oxidação do NADH ( $\approx 0,8$  V *vs* NHE), de acordo com o mecanismo representado pelas equações 2.10 a 2.12 (Sprules *et al.*, 1996; Mariotti *et al.*, 2006). Tal facto permite o acompanhamento através de métodos electroquímicos das reacções onde o co-factor se encontra envolvido, sem a necessidade de operar a potenciais elevados, reduzindo assim o risco de ocorrência de reacções inespecíficas.



A equação 2.10 traduz a formação de um complexo em solução, entre o NADH e o mediador. O complexo formado dissocia-se através de uma reacção redox química (eq. 2.11) e em seguida o mediador reduzido é reoxidado por via electroquímica no eléctrodo de trabalho (eq. 2.12).

Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura II.31 mostram as alterações ocorridas quando se adiciona 2 mM de NADH a 0,5 mM de AM e, por fim, o comportamento do sistema na presença de quantidades crescentes de sulfito.

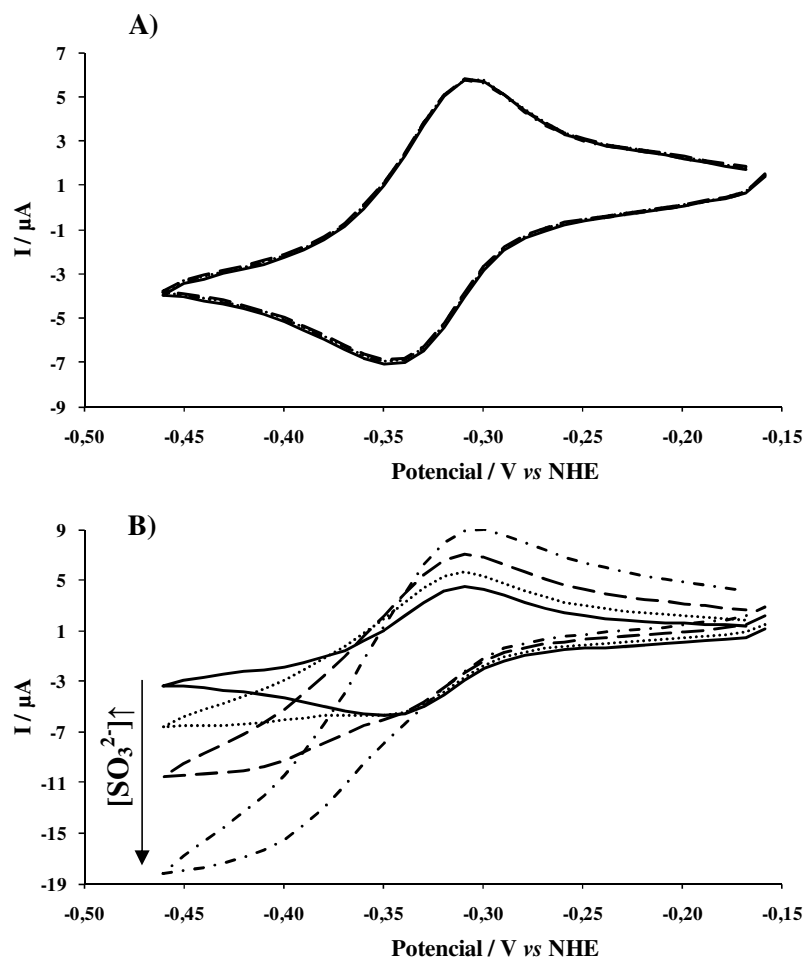


**Fig. II.31:** Ensaios como sistema mediador azul de Meldola/NADH a pH 7,6: (—) 0,5 mM AM, (•••••) 0,5 mM AM e 2mM NADH, (---) 0,5 mM AM, 2mM NADH e 0,1 mM  $\text{SO}_3^{2-}$ , (-•-) 0,5 mM AM, 2mM NADH e 1 mM  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Os resultados apresentados na figura II.31 demonstram que ocorre uma nítida diminuição da intensidade do sinal produzido pelo AM (na presença de NADH) aquando da adição de concentrações crescentes de sulfito. Este facto deve-se à precipitação do AM a qual é, inclusivamente visível na célula electroquímica, com a solução, inicialmente fortemente corada pelo mediador, a ficar amarela e com um depósito sólido no fundo.

#### II.4.5.5 – Viologénio de Benzilo

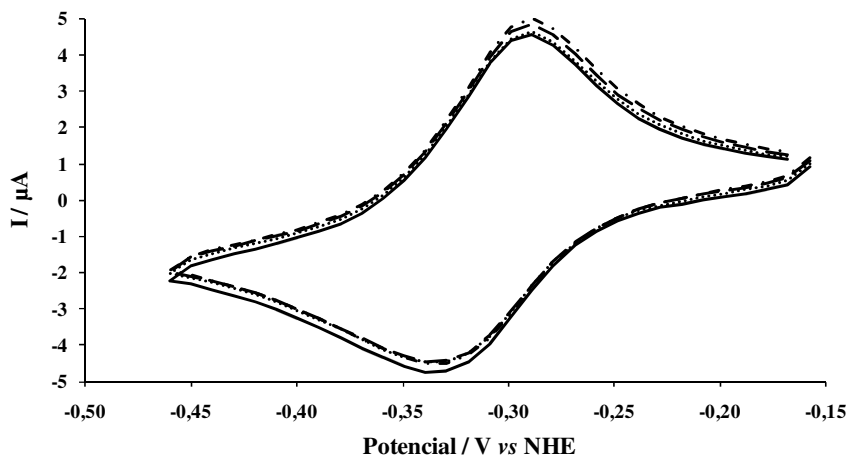
Na figura II.32 encontram-se representados voltamogramas cíclicos obtidos com 1 mM de viologénio de benzilo (VB), em ambos os electrólitos de suporte, na presença de concentrações de sulfito crescentes.



**Fig. II.32:** Ensaios realizados com viologénio de benzilo e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (•••••) 1 mM, (---) 10 mM, (-•-) 20 mM. **A)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6. **B)** Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5.

A pH 5,5, o comportamento electroquímico do VB é semelhante ao verificado para o AB e para o VM, e poderá, por isso, ser compreendido de forma análoga. Contudo, neste caso, não foram observados quaisquer efeitos provocados pela adição de sulfito nos voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6, até uma concentração de 20 mM.

Como os voltamogramas cíclicos do mediador não foram afectados pela presença do substrato, procedeu-se à realização de ensaios com a enzima aprisionada à superfície do eléctrodo de trabalho e com o VB em solução. Na figura II.33 encontra-se um exemplo representativo de tais experiências, tendo as adições de sulfito sido iniciadas com uma concentração de 100  $\mu$ M na célula electroquímica.



**Fig. II.33:** Ensaios com enzima na presença do mediador viologénio de benzilo. Voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6 com 375pmol de Dsv aprisionada na superfície do GCE com uma membrana de diálise, 1mM de VB em solução e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (•••••) 1 mM, (— —) 10 mM, (—•—) 20 mM.

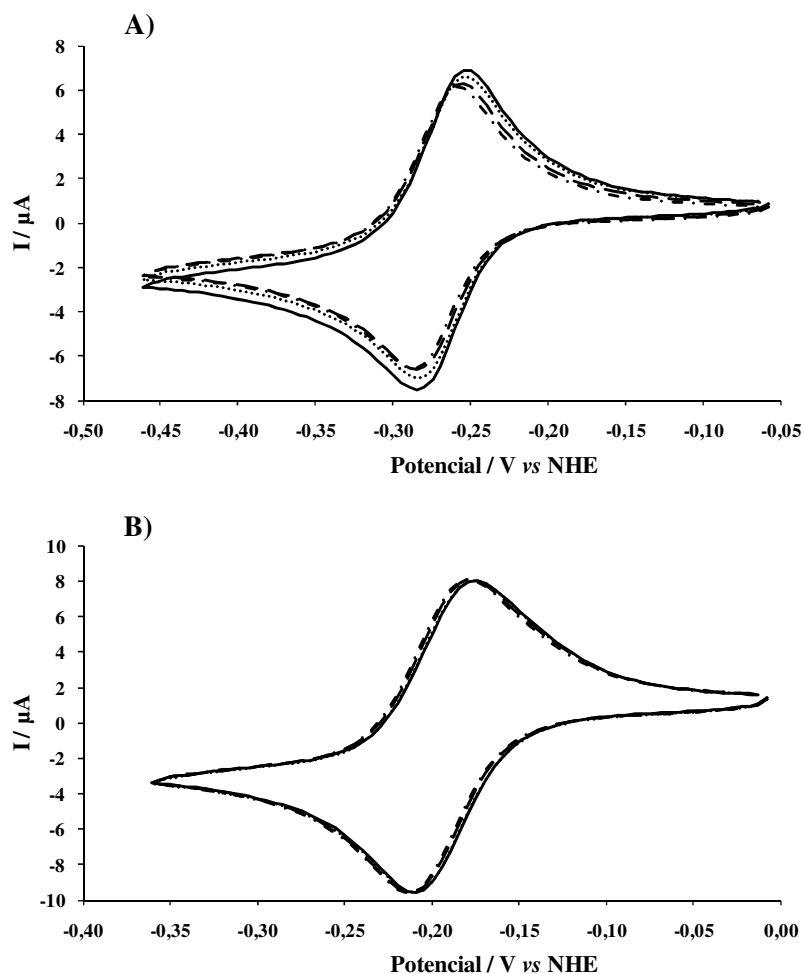
Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura II.33 demonstram que não foi observada a existência de correntes electrocatalíticas, facto que reforça a possibilidade de a enzima não se encontrar activa.

#### II.4.5.6 – Fenosafranina

A fenosafranina (Fs) é um composto pertencente à mesma família química que o vermelho neutro, as fenazinas e, à semelhança do que acontece com o VN, este composto também é electropolimerizável em meio ácido. Porém, a reacção de polimerização apenas ocorre nos casos em que a janela de potencial é substancialmente alargada no sentido positivo, até 1,3 V (Selvaraju & Ramaraj, 2003). Neste caso, o SO<sub>2</sub> não será um oxidante suficientemente forte para iniciar o processo de polimerização.

Os voltamogramas cíclicos traçados na presença de 1mM de Fs dissolvida em ambos os electrólitos de suporte apresentam-se na figura II.34.

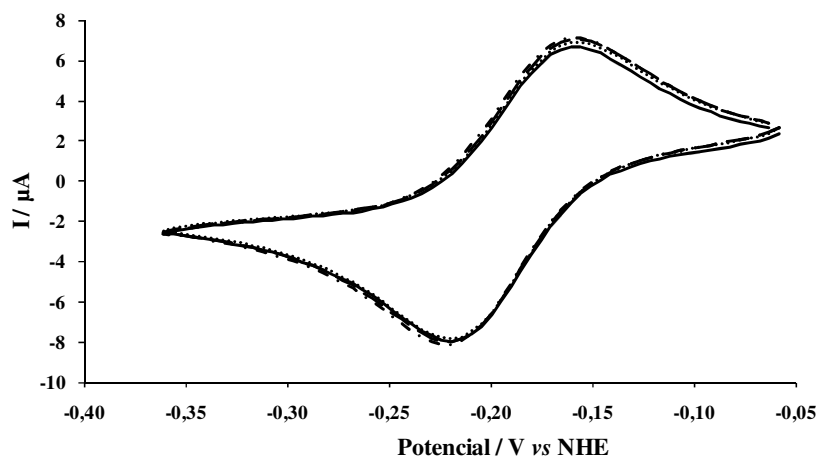




**Fig. II.34:** Ensaios realizados com fenosafranina e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (.....) 1 mM, (---) 10 mM, (-.-) 20 mM. A) Voltamogramas cíclicos traçados a pH 7,6. B) Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5.

A pH 7,6 (fig.II.34A), observa-se que, na presença de sulfito ocorre uma diminuição na intensidade do sinal do mediador. Embora a Fs seja solúvel em água, encontram-se reportados problemas de solubilidade deste composto (Silveira *et al.*, 2010) em soluções tampão a este pH. Assim, é possível que ocorra uma diminuição da solubilidade do mesmo devido ao aumento da concentração salina do meio.

Na ausência de alterações nos perfis voltamétricos da Fs a pH 5,5, na presença de sulfito, prosseguiu-se com ensaios enzimáticos, na presença deste corante, dos quais resultaram os voltamogramas da figura II.35.



**Fig. II.35:** Ensaios com enzima na presença do mediador fenosafranina. Voltamogramas cíclicos traçados a pH 5,5 com 375pmol de Dsv aprisionada na superfície do GCE com uma membrana de diálise, 1mM de Fs em solução e concentrações crescentes de sulfito: (—) 0 mM, (•••••) 1 mM, (— —) 10 mM, (—•—) 20 mM.

Também nesta situação se verifica que o mediador Fs não é adequado à aplicação num biossensor baseado na actividade da Dsv, dado que não foram observadas correntes electrocatalíticas na presença de substrato. Na secção II.4.2.3 foi equacionada a possibilidade de a enzima não se encontrar activa por ausência de co-factores, podendo ser esse o motivo para a ausência de catálise. Porém, salienta-se também o facto de a Fs ser, de entre os mediadores testados, aquela que apresenta o potencial de redução mais elevado (-0,255 V), o qual poderá não ser suficiente para reduzir a Dsv ( $E^{0'}_1 \approx -298 \text{ mV vs NHE}$ ;  $E^{0'}_2 \approx -620 \text{ mV vs NHE}$ ; Lui & Cowan, 1994), mesmo que a proteína se encontre íntegra.

## II.5 – Conclusões e Perspectivas

A realização deste trabalho permitiu concluir que o novo procedimento de purificação proposto para isolar a redutase do sulfito dissimilatória desulfoviridina proveniente da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 permitiu a obtenção de proteína pura e no seu estado nativo (configuração do multímero  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ). A determinação de ferro não foi conclusiva, no sentido em que não foi possível determinar se a diferença entre o resultado obtido (17 átomos de Fe por molécula de Dsv) e os 34 átomos de ferro descritos na estrutura da proteína de *D. vulgaris* advém da perda de co-factores no decurso da purificação ou se, existe nos métodos de quantificação algum interferente passível de influenciar o resultado final. Porém, a ausência de actividade catalítica verificada no decurso dos ensaios electroquímicos aponta para uma maior probabilidade de a primeira hipótese ser a correcta.

A determinação da sequência de resíduos de aminoácidos que constituem a proteína foi igualmente bem sucedida, assim como a simulação da sua estrutura tridimensional.

No decurso dos trabalhos de preparação desta tese, foram adquiridos conhecimentos com a descodificação do genoma de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e com a resolução da estrutura cristalográfica da desulfoviridina de *D. vulgaris* Hildenborough, os quais poderão também ser empregues no cumprimento daquele que era o principal propósito deste trabalho. Tais avanços eram indispensáveis para a eventual criação de mutantes da Dsv. A possibilidade de modelar a estrutura da Dsv com a criação de mutantes permitiria assim aumentar a capacidade de interacção com os eléctrodos de trabalho, evitando assim o recurso a um mediador electrónico, e/ou aumentar a actividade da enzima.

Um outro aspecto muito interessante para explorar seria a possibilidade de aplicar a SiRHP de *E. coli* como elemento de reconhecimento biológico num biossensor de sulfitos. Esta proteína, na sua forma monomérica, apresenta dimensões substancialmente mais reduzidas que a Dsv, o seu centro activo encontra-se bem mais exposto (ver figura II.6), sendo activa nesta forma (Siegel & Davis, 1974), com uma cinética de reacção para o sulfito incomparavelmente mais rápida ( $k_{cat}/K_M = 3,6 \times 10^6 \text{ e}^- \text{ M s}^{-1} \text{ hemo}^{-1}$ ) ( Siegel *et al.*, 1982). Não menos aliciante é o facto de ser uma excelente candidata à realização de uma caracterização electroquímica exaustiva pois não se encontra na literatura quaisquer referências a trabalhos desse género com esta enzima.

## II.6 – Referências Bibliográficas

- Abass A.K., Hart J.P., Cowell D., *Sensor. Actuat. B – Chem.*, 62:148-153, **2000**.
- Akagi J.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117:530-535, **1983**.
- Akagi J.M., In L.L. Barton Ed., *Sulfate-Reducing Bacteria*, Plenum Press, New York, **1995**.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, **1997**.
- Andrusier N., Nussinov R., Wolfson H.J., *Proteins*, 69:139-159, **2007**.
- AOAC International (11/11/2010): <http://www.eoma.aoac.org/>
- Araújo A.N., Couto C.M.C.M., Lima J.L.F.C., Montenegro M.C.B.S.M., *J. Agric. Food. Chem.*, 46:168–172, **1998**.
- Ardakani M.M., Habibollahi F., Zare H.R., Naeimi H., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3:1236-1247, **2008**.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., *Bioinformatics*, 22:195-201, **2006**.
- Avramescu A., Noguer T., Magearu V., Marty J.-L., *Anal. Chim. Acta*, 433:81-88, **2001**.
- Badr I.H.A., Plata A., Molina P., Alajarin M., Vidal A., Bachas L.G., *Anal. Chim. Acta*, 388:63-69, **1999**.
- Beelman R.B., Gallander J.F., *Wine Deacidification*, In C.O. Chinchester Ed., *Advances in Food Research*, Vol. 25, pp. 1-54, Academic Press Inc., New York, **1979**.
- Bianco P., Haladjian J., *Biochimie*, 76:605-613, **1994**.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E., *Principles and Practice of Winemaking*, Chapman & Hall, pp.448-473, **1996**.
- Carballo R., Dall’Orto V.C., Balbo A.L., Rezzano I., *Sensor. Actuat. B- Chem.*, 88:155-161, **2003**.
- Cardwell T.J., Christophersen M., *Anal. Chim. Acta*, 416:105–110, **2000**.
- Chen G.N., Liu J.S., Duan J.P., Chen H.Q., *Talanta*, 53:651–660, **2000**.
- Čmelík S., Machát J., Niedobvá E., Otruba V., Kanický V., *Anal. Bioanal. Chem.*, 383:483-488, **2005**.
- Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, Vol.2, MA-E-AS323-04-DIOSOU, OIV, Paris, **2006**.
- Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter J.C., Glavina T., Hammon N., Israni S., Pitluck S., Goodwin L.A., Schmutz J., Larimer F., Land M., Kyrpides N., Ivanova N., Richardson P., *EMBL/GenBank/DBJ databases*, **2005**.
- Crane B.R., Getzoff E.D., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 6:744-756, **1996**.

- Crane B.R., Siegel L.M., Getzoff E.D., *Science*, 270:59-67, **1995**.
- Crane B.R., Siegel L.M., Getzoff E.D., *Biochemistry*, 36:12101-12119, **1997A**.
- Crane B.R., Siegel L.M., Getzoff E.D., *Biochemistry*, 36:12120-12137, **1997B**.
- Curvelo-Garcia A.S.; *Controlo de Qualidade dos Vinhos – Química Enológica Métodos Analíticos*; Instituto da Vinha e do Vinho; **1988**.
- Dadamos T.R.L., Teixeira M.F.S., *Electrochim. Acta*, 54:4552-4558, **2009**.
- Dahl C., Kredich N.M., Deutzmann R., Trüper H.G., *J. Gen. Microbiol.*, 139:1817-1828, **1993**.
- Decreto-Lei n.º 121/98, *Diário da República Série I - A*, n.º106, pp. 2142-2153, **08-05-1998**.
- de Marcos S. , Alcubierre N., Galban J., Castillo J.R., *Anal. Chim. Acta*, 502:7-13, **2004**.
- DerVartanian D.V., *Methods Enzymol.*, 243:270-276, **1994**.
- Dinçkaya E., Sezgintürk M.K., Alkyilmaz E., Ertas F.N., *Food Chem.*, 101:1540-1544, **2007**.
- Directiva 95/2/CE do Parlamento, *Jornal Oficial da União Europeia*, L61:1-53, **18-03-1995**.
- Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H.J., In Gusfield *et al.* Ed., *Lecture Notes in Computer Science* 2452:185-200, Springer Verlag, **2002**.
- Dunbar B.S., *Protein Blotting – A Practical Approach*, IRL Press, **1994**.
- Ensafi A.A., Karimi – Maleh H., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5:392-406, **2010**.
- Fäldt S., Karlberg B., Frenzel W., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371:425-430, **2001**.
- FDA–21CFR(10/11/2010):  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=130.9>
- Fisher D.S., Price D.C., *Clin. Chem.*, 10:21-31, **1964**.
- Friedman M., *J. Agric. Food Chem.*, 44: 631 – 653, **1996**.
- García T., Casero E., Lorenzo E., Pariente F., *Sens. Actuators B*, 106: 803-809, **2005**.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; In John M. Walker Ed., *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571-607, Humana Press, **2005**.
- Guex N., Peitsch M. C., *Electrophoresis*, 18: 2714-2723, **1997**.
- Hart J.P., Abass A.K., Cowell D.C., Chappell A., *Electroanalysis*, 11:406-411, **1999**.
- Hatchikian E.C., *Methods Enzymol.*, 243: 276 – 295, **1994**.
- Hatchikian E.C., Zeikus J.G., *J. Bacteriol.*, 153: 1211 – 1220, **1983**.

- Heidelberg J.F., Seshadri R., Haveman S.A., Hemme C.L., Paulsen I.T., Kolonay J.F., Eisen J.A., Ward N.L., Methe B.A., Brinkac L.M., Daugherty S.C., DeBoy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Madupu R., Nelson W.C., Sullivan S.A., Fouts D.E., Haft D.H., Selengut J., Peterson J.D., Davidsen T.M., Zafar N., Zhou L., Radune D., Dimitrov G., Hance M., Tran K., Khouri H.M., Gill J., Utterback T.R., Feldblyum T.V., Wall J.D., Voordouw G., Fraser C.M., *Nat. Biotechnol.*, 22: 554-559, **2004**.
- Hittel D.S., Voordouw G., *Antonie van Leeuwenhoek*, 77:271-280, **2000**.
- Iyengar R., McEvily A.J., *Trends Food Sci. Tech.*, 3:60-64, **1992**.
- Jankovskiene G., Daunoravicius Z., Padarauskas A., *J. Chromatogr. A*, 934:67-73, **2001**.
- Ji A.J., Savon S.R., Jacobsen D.W., *Clin. Chem.*, 41:897-903, **1995**.
- Joslyn M.A., *Am. J. Enol. Vitic.*, 6(3): 1-10, **1955**.
- Karkov-Schweizer R.R., Bruschi M., Voordouw G., *Eur. J. Biochem.*, 211:501-507, **1993**.
- Karkov-Schweizer R.R., Huber D.P.W., Voordouw G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:290-296, **1995**.
- Kein M., Friedrich M., Roger A.J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., Blackale L.L., Stahl D.A., Wagner M., *J. Bacteriol.*, 183:6028-6035, **2001**.
- Klenk H.-P., Clayton R.A., Tomb J.-F., White O., Nelson K.E., Ketchum K.A., Dodson R.J., Gwinn M.L., Hickey E.K., Peterson J.D., Richardson D.L., Kerlavage A.R., Graham D.E., Kypides N.C., Fleischmann R.D., Quackenbush J., Lee N.H., Sutton G.G., Gill S.R., Kirkness E.F., Dougherty B.A., McKenney K., Adams M.D., Loftus B.J., Peterson S.N., Reich C.I., McNeil L.K., Badger J.H., Glodek A., Zhou L., Overbeek R., Gocayne J.D., Weidman J.F., McDonald L.A., Utterback T.R., Cotton M.D., Spriggs T., Artiach P., Kaine B.P., Sykes S.M., Sadow P.W., D'Andrea K.P., Bowman C., Fujii C., Garland S.A., Mason T.M., Olsen G.J., Fraser C.M., Smith H.O., Woese C.R., Venter J.C., *Nature*, 390:364-370, **1997**.
- Lambrecht H.S., *Enzymatic Browning and its Prevention*, Ed. Chang Y. Lee & Jonh R. Whitaker, ACS Symposium Series, Vol. 600, chapter 24: 313-323, **1995**.
- Larsen Ø., Lien T., Birkeland N.-K., *Extremophiles*, 3: 63-70, **1999**.
- Larsen Ø., Lien T., Birkeland N.-K., *FEMS Microbiol. Lett.*, 186: 41-46, **2000**.
- Laue H., Friedrich M., Ruff J., Cook A.M., *J. Bacteriol.*, 183: 1727-1733, **2001**.
- Lee J.-P., LeGall J., Peck Jr. H.D., *J. Bacteriol.*, 115: 529 – 542, **1973**.
- Lee J.-P., Peck Jr. H.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45: 583 – 589, **1971**.
- Lee J.-P., Yi C.-S., LeGall J., Peck Jr. H.D., *J. Bacteriol.*, 115: 453 – 455, **1973**.
- Li Y., Zhao M., *Food Control*, 17:975 – 980, **2006**.
- Liu M.-C., Peck Jr. H.D., *J. Biol. Chem.*, 256: 13159 – 13164, **1981**.
- Lowinsohn D., Alipázaga M.V., Coichev N., Bertotti M., *Microchim. Acta*, 144:57 – 62, **2004**.

- Lowinsohn D., Bertotti M., *Food Addit. Contam.*, 18:773 – 777, **2001**.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 193: 265 – 275, **1975**.
- Lucas S., Copeland A., Lapidus A., Glavina del Rio T., Tice H., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Sims D., Lu M., Kiss H., Meineke L., Brettin T., Detter J.C., Han C., Larimer F., Land M., Hauser L., Kyrpides N., Ovchinnikova G., Hazen T.C., *EMBL/GenBank/DDBJ databases*, **2009**.
- Lui S.M., Cowan J.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:11538 – 11549, **1994**.
- Lui S.M., Soriano A., Cowan J.A., *Biochem. J.*, 304: 441 – 447, **1994**.
- Luo Y., Brayer G.D., *J. Mol. Biol.*, 214: 585 – 595, **1990**.
- Makarov S.V., Kudrick E.V., van Eldik R., Naidenko E.V., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 22:4074-4076, **2002**.
- Mander G.J., Weiss M.S., Hedderich R., Kahnt J., Ermler U., Warkentin E., *FEBS Lett.*, 579:4600-4604, **2005**.
- Mariotti M.P., Riccardi C.S., Fertoni F.L., Yamanaka H., *J. Braz. Chem. Soc.*, 17:689-696, **2006**.
- Marriott S.J., Hagen W.R., *Eur. J. Biochem.*, 238:724-727, **1996**.
- Masár M., Danková M., Ölvecká E., Stachurová A., Kaniánsky D., Stanislawski B., *J. Chromatogr. A*, 1026:31–39, **2004**.
- Mashiach E., Schneidman-Duhovny D., Andrusier N., Nussinov R., Wolfson H.J., *Nucleic Acids Res.*, 36:229-232, **2008**.
- McFeeters R.F., Barish A.O., *J. Agric Food Chem.*, 51:1513-1517, **2003**.
- McWeeny D.J., Knowles M.E., Hearne J.F., *J. Sci. Food Agr.*, 25: 735 – 746, **1974**.
- Mizuno N., Voordouw G., Miki K., Sarai A., Higuchi Y., *Structure*, 11: 1133 – 1140, **2003**.
- Monier-Williams G.W., *Analyst*, 52:415-416, **1927**.
- Morse R., Gibson G.R., Collins M.D., *Lett. Appl. Microbiol.*, 30:375-378, **2000**.
- Moura I., LeGall J., Lino A.R., Peck Jr. H.D., Fauque G., Xavier A.V., DerVartanian D.V., Moura J.J.G., Huynh, *J. Am. Chem. Soc.*, 110:1075 – 1082, **1988**.
- Murphy M.J., Siegel L.M., Tove S.R., Kamin H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71:612-616, **1974**.
- Oliveira T.F., Vonrhein C., Matias P.M., Venceslau S.S., Pereira I.A.C., Archer M., *J. Biol. Chem.*, 283: 34141-34149, **2008**.
- Papkovsky D., Uskova M.A., Ponomarev G.V., Korpela T., Kulmala S., Guilbault G.G., *Anal. Chim. Acta*, 374:1-9, **1998**.
- Parey K., Warkentin E., Kroneck P.M.H., Ermler U., *Biochemistry*, 49:8912-8921, **2010**.

- Pauliukaite R., Ghica M.E., Barsan M.M., Brett C.M.A., *Anal. Lett.*, 43: 1588-1608, **2010**.
- Peck, Jr. H.D., LeGall J., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 298:443-466, **1982**.
- Pierik A.J., Duyvis M.G., van Helvoort J.M.L.M., Wolbert R.B.G., Hagen W.R., *Eur. J. Biochem.*, 205: 111-115, **1992**.
- Pizzoferrato L., di Lullo G., Quattrucci E., *Food Chem.*, 63:275-279, **1998**.
- Pourbaix M.J.N., *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solution*, Ed. J.A. Franklin, 2<sup>nd</sup> Ed., National Association of Corrosion Engineering (NACE), Houston, USA, p. 551, **1974**.
- Pournaghi – Azar M.H., Hydarpour M., Dastangoo H., *Anal. Chim. Acta*, 497:133-141, **2003**.
- Protein Electrophoresis – technical manual*, 80-6013-88, Amersham Biosciences, USA, **1999**.
- Raoof J.B., Ojani R., Karimi-Maleh H., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2: 257-269, **2007**.
- Regulamento CE n.º 606/2009, *Jornal Oficial da União Europeia*, L193:1-59, **24-07-2009**.
- Rivas M.G., Carepo M.S.P., Mota C.S., Korbas M., Durand M.-C., Lopes A.T., Brondino C.D., Pereira A.S., George G.N., Dolla A., Moura J.J.G., Moura I., *Biochemistry*, 48: 873-882, **2009**.
- Saikia P.M., Kalita A., Gohain B., Sarma S., Dutta R.K., *Colloids Surf. A*, 216:21-26, **2003**.
- Saleh F.S., Rahman M.R., Okajima T., Mao L., Ohsaka T., *Bioelectrochemistry*, 80:121-127, **2011**.
- Sayavedra-Soto L.A., Montgomery M.W., *J. Food Sci.*, 51:1531-1536, **1986**.
- Schedel M., LeGall S., Baldensperger J., *Arch. Microbiol.*, 105:339-341, **1975**.
- Schedel M., Vanselow M., Trüper H.G., *Arch. Microbiol.*, 121:29-36, **1979**.
- Schiffer A., Parey K., Warkentin E., Diederichs K., Huber H., Stetter K.O., Kroneck P.M.H., Ermler U., *J. Mol. Biol.*, 379:1063-1074, **2008**.
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J., *Nucl. Acids. Res.*, 33:W363-367, **2005 (A)**.
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J., *Proteins*, 60:224-231, **2005 (B)**.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C., *Nucleic Acids Res.*, 31: 3381-3385, **2003**.
- Segundo M.A., Rangel A.O.S.S., *Anal. Chim. Acta*, 427:279-286, **2001**.
- Selvaraju T., Ramaraj R., *Electrochem. Commun.*, 5:667-672, **2003**.
- Shappovalov S.A., Koval V.L., Chernaya T.A., Pereverzev A.Y., Derevyanko N.A., Ishchenko A.A., Mchedlov-Petrosyan N.O., *J. Braz. Chem. Soc.*, 16:232-240, **2005**.
- Shriver D.F., Atkins P.W., *Inorganic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, Oxford University Press, pp. 395 – 398, **1999**.
- Siegel L.M., Davis P.S., *J. Biol. Chem.*, 249:1687-1598, **1974**.



- Siegel L.M., Davis P.S., Kamin H., *J. Biol. Chem.*, 249:1572-1586, **1974**.
- Siegel L.M., Rueger D.C., Barber M.J., Kruger R.J., Orme-Johnson W.H., *J. Biol. Chem.*, 257:6343-6350, **1982**.
- Silveira C.M., Besson S., Moura I., Moura J.J.G., Almeida M.G., *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010:634597, **2010**.
- Situmorang M., Hibbert D.B., Gooding J., Barnett D., *Analyst*, 124:1775-1779, **1999**.
- Smith P.K., Krohn R.J., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Anal. Biochem.*, 150:76-85, **1985**.
- Spricigo R., Dronov R., Lisdat F., Leimkühler S., Scheller F.W., Wollenberger U., *Anal. Bioanal. Chem.*, 393:225-233, **2009**.
- Sprules S.D., Hart J.P., Pittson R., Wring S.A., *Electroanalysis*, 8:539-543, **1996**.
- Stahl D.A., Fishbain S., Klein M., Baker B.J., Wagner M., *Antonie van Leeuwenhoek*, 81:189-195, **2002**.
- Stangelmayer A., Klimant I., Wolfbeis O.S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362:73-76, **1998**.
- Steuber J., Arendsen A.F., Hagen W.R., Kroneck P.M.H., *Eur. J. Biochem.*, 233:873-879, **1995**.
- Stone K. L., Williams K.R., *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Ed. Paul Matsudaira, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, San Diego, USA, pp.54-56, **1993**.
- Strehlitz B., Gründig B., Vorlop K.-D., Bartholmes P., Kotte H., Stottmeister U., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349:676-678, **1994**.
- Stroupe M.E., Getzoff E.D.; In Messerschmidt A., Huber R., Poulos T. and Wieghardt K. Ed., *Handbook of Metalloproteins*, pp. 471-485, John Wiley & Sons, Ltd. Chinchester, **2001**.
- Thanh N.T.K., Decnopweever L.G., Kok W.T., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349:469-472, **1994**.
- Taylor S.L., Higley N.A., Bush R.K., *Advances in Food Research*, Ed. C.O. Chichester, Academic Press Inc., 30: 1-76, **1986**.
- The Merck Index*, Published on CD-ROM by Chapman & Hall/CRC, Hampden Data Services Ltd, **1999**.
- Trudinger P.A., *J. Bacteriol.*, 104: 158-170, **1970**.
- Tudorache M., Bala C., *Anal. Bioanal. Chem.*, 388: 565-578, **2007**.
- Vally H., Misso N.L.A., Madan V., *Clin. Exp. Allergy*, 39: 1643-1651, **2009**.
- Vasilescu A., Noguer T., Andreescu S., Calas-Blanchard C., Bala C., Marty J.-L., *Talanta*, 59: 751-765, **2003**.
- Wagner M., Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stahl D.A., *J. Bacteriol.*, 180: 2975-2982, **1998**.

Wicchelman K., Braun R., Fitzpatrick J., *Anal. Biochem.*, 175: 231-237, **1988**.  
Wolfe B.M., Lui S.M., Cowan J.A., *Eur. J. Biochem.*, 223: 79-89, **1994**.  
Yilmaz U.T., Somer G., *Anal. Chim. Acta*, 603:30-35, **2007**.  
Zhao M., Hibbert B., Gooding J., *Anal. Chim. Acta*, 556:195-200, **2006**.  
Zhou H., Yang W., Sun C., *Talanta*, 77:366-371, **2008**.

## **II.7 – Bases de Dados e Programas Informáticos de Livre Utilização**

<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>  
<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>  
<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/>  
<http://swissmodel.expasy.org/>  
[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)  
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>  
<http://www.expasy.ch/>  
<http://www.genome.jp/kegg/>  
<http://www.uniprot.org/>  
<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>